

**UNESC – UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE**

**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BACHARELADO**

**EDUARDO NETTO**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM ORGANISMOS  
BIOINDICADORES EXPOSTOS À DRENAGEM ÁCIDA DE MINA DE  
CARVÃO ANTES E APÓS O SEU TRATAMENTO COM  
SEDIMENTOS GERADOS EM ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE  
EFLUENTES**

**CRICIÚMA, NOVEMBRO DE 2010.**

**EDUARDO NETTO**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM ORGANISMOS BIOINDICADORES  
EXPOSTOS À DRENAGEM ÁCIDA DE MINA DE CARVÃO ANTES E APÓS O  
SEU TRATAMENTO COM SEDIMENTOS GERADOS EM ESTAÇÃO DE  
TRATAMENTO DE EFLUENTES**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado para  
obtenção do grau de Bacharelado em Ciências  
Biológicas da Universidade do Extremo Sul  
Catarinense, UNESC.

Orientador: Prof. Dr. Jairo José Zocche  
Co-orientador: Prof. Dr. Reginaldo Geremias

CRICIÚMA, NOVEMBRO DE 2010.

**EDUARDO NETTO**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM ORGANISMOS  
BIOINDICADORES EXPOSTOS À DRENAGEM ÁCIDA DE MINA DE  
CARVÃO ANTES E APÓS O SEU TRATAMENTO COM  
SEDIMENTOS GERADOS EM ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE  
EFLUENTES**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora para obtenção do Grau de Bacharel, no Curso de Ciências Biológicas da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, com Linha de Pesquisa em Ecotoxicologia.

Criciúma, 26 de novembro de 2010.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Reginaldo Geremias (UFSC) - Co-orientador

Prof. Claus Tröger Pich – Dr. – (UFSC)

Prof. Nadja Zim Alexandre - Msc. - (UNESC)

Dedico este trabalho à minha mãe Marilúcia Netto Gaspar e à minha avó Ivaneide dos Santos Netto, que sempre me deram todo o apoio para que eu continuasse firme durante a minha graduação.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por me trazer a esta vida e permitir com que eu realizasse todos os sonhos que me passaram pela minha mente até o momento, e que permitirá que eu realize todos aqueles que passarem pela minha mente no futuro.

Agradeço, também, à minha família, especialmente à minha mãe Marilúcia Netto Gaspar, e à minha avó Ivaneide dos Santos Netto, por me darem todo o apoio possível durante a minha formação acadêmica e por me incentivarem sempre a estudar cada vez mais, me motivando nos momentos mais difíceis.

À minha grande e eterna amiga, que conheci durante o período em que ela permaneceu aqui em Criciúma, na faculdade de Ciências Biológicas, sendo colegas de turma, Denise Sisti Peres Bendhack, que foi para Aracajú, capital de Sergipe, com seu marido, para continuar a faculdade por lá (devido aos seus planos de pesquisa com os recifes de corais), e que me deu também o maior apoio que um amigo pode dar a outro: ajuda nos trabalhos da faculdade; incentivo para estudar para as provas; inúmeros conselhos (que me serviram de incentivo para continuar firme, levando a sério os estudos e a vida dentro da faculdade e fora dela); as inúmeras gargalhadas que compartilhamos, rindo das histórias que ela me contava dos seus cinco cachorros e duas gatas, são eles: o Pingo (o de três pernas, pois foi atropelado e ela o encontrou na rua), o Jack Grandão; as duas irmãs metralhas (a Lili e a Lulu) e a Poly (a chichuaua), as duas gatas (a Biba e Pituca) e a Princesa (uma cachorra grandona, destrambelhada, que tinha sangue de *American Pit Bull* e instinto de caçadora, segundo as palavras dela), que teve que ficar por aqui, em Criciúma. Um dia, se Deus quiser vou viajar para Aracajú para vê-la novamente e matar as saudades. Boa Sorte, Denise!

Ao meu orientador Prof. Dr. Jairo José Zocche, por aceitar ser meu orientador, após a saída do Prof. Dr. Reginaldo Geremias, por acreditar em mim e no meu potencial e pela ajuda disponibilizada para escrever este trabalho.

Ao Prof. Dr. Claus Tröger Pich, por me dar a oportunidade de estagiar no seu grupo de pesquisa (GPIG – Grupo de Pesquisa em Imunologia e Genética) enquanto estive na Universidade, no qual comecei no dia 22/09/08 (esta data jamais será esquecida), por acreditar em mim, no meu potencial e por me dar todo o apoio e incentivo para que eu acompanhasse os experimentos em laboratório e aprendesse o que sei hoje, pelos ensinamentos repassados em laboratório, e, também, por solicitar as bolsas de Iniciação Científica do PIBIC (Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica), nos anos de

2009/2010 e 2010/2011 que estão sendo tão importantes na minha vida acadêmica para obter experiência profissional. O meu “muito obrigado”, de coração!

Ao Prof. Dr. Reginaldo Geremias, por aceitar ser meu orientador, enquanto estive na Universidade e pela ajuda na continuação deste trabalho como co-orientador, por me apoiar e incentivar muito durante o desenvolvimento do projeto deste Trabalho de Conclusão de Curso, por me apoiar, e motivar para que eu aprendesse a realizar todos os experimentos durante os experimentos realizados para o Projeto do PIBIC 2009/2010 e também para o TCC. Agradeço imensamente a sua colaboração no desenvolvimento deste Trabalho por inteiro.

À coordenadora do Curso de Ciências Biológicas, Miriam da Conceição Martins, por me dar todo o apoio, por sempre acreditar no meu potencial e por estar sempre ao meu lado quando mais precisei. Agradeço-lhe de todo o coração!

Às amigas de coração, Helen Nuernberg Ronchi e Thatiane Cordini Fernandes, por me ajudarem no desenvolvimento deste Trabalho e pelas dicas e risadas que compartilhamos em nossos encontros com o Reginaldo para sermos orientados para o desenvolvimento deste trabalho. Aos colegas de laboratório, Ariana de Bona, Alexandre Blos Borges, Fernanda Zanette da Silveira, Maiara da Silva Francisconi, Gean Pizzolotto e outros, pelas brincadeiras que me faziam rir de tão engraçadas, por me ajudarem nos experimentos realizados em laboratório para este Trabalho, pelas palavras de motivação e conselhos. À colega de turma Priscila Tramontin Bianchini, pela ajuda disponibilizada na formatação deste trabalho. E também, o meu “muito obrigado” à outra grande amiga, Tamires Regina Kirsh, pelos conselhos, pela ajuda nos trabalhos da faculdade, pelas brincadeiras e risadas que compartilhamos durante a faculdade. Vocês jamais serão esquecidos! Amo vocês todos!

Ao PIBIC pela aprovação dos projetos de pesquisa e concessão das bolsas, estas, que estão me ajudando muito a conseguir experiência profissional, o que vou precisar por toda a minha vida acadêmica. Aos professores que se dispuseram a me orientar nesses projetos de pesquisa.

À minha fonoaudióloga Silvânia Ascari Garcia, que também me deu todo para que eu continuasse os meus estudos, sempre me motivando a continuar.

Queria agradecer também, ao professor D. B. Johnson, da University of Bangor, Reino Unido, autor do artigo “Acid mine drainage remediation options: a review” pelas dúvidas esclarecidas por e-mail para a correção final deste trabalho.

Enfim, a todos que diretamente ou indiretamente colaboraram para a realização deste Trabalho.

**“A ciência não passa do bom senso exercitado e organizado.” (Aldous Huxley)**

## RESUMO

A atividade mineradora de carvão produz vários contaminantes potencialmente tóxicos, entre eles encontra-se a drenagem ácida de mina (DAM), caracterizada pela expressiva acidez ( $\text{pH} < 3,0$ ) e elevadas concentrações de metais como Fe, Al, Mn, Zn, Cu e Cd. Em geral, o tratamento destas drenagens em Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) é feita através de uma pré-correção de pH e precipitação de metais. Entretanto, neste processo há a geração de sedimentos (lodo), o qual não é aproveitado economicamente. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade em organismos expostos à drenagem ácida de mina antes e após o seu tratamento com sedimentos gerados em ETE. Para tanto, amostras de DAM foram submetidas ao tratamento com o sedimento calcinado, sendo determinado o pH, as concentrações dos metais Fe, Al, Mn, Zn, Cu e Cd, além de ensaios de toxicidade aguda ( $\text{CL}_{50}$ ) em *Artemia* sp., fitotoxicidade em *Allium cepa* L. e testes de clivagem de DNA plasmidial *in vitro*, antes e após o tratamento. Os resultados permitem demonstrar que a drenagem não tratada apresentou expressiva acidez ( $\text{pH} = 2,81$ ) e elevada concentração de metais (Fe = 145,96; Al = 120,20; Mn = 22,09; Zn = 2,86 e Cu = 0,12  $\text{mg.L}^{-1}$ ), sendo que após o tratamento houve a redução da acidez ( $\text{pH} = 7,29$ ) e dos metais (Fe = 0,32; Al = 0,40; Mn = 0,88 ; Zn = 0,02 e Cu = 0,05  $\text{mg.L}^{-1}$ ). Constatou-se que a DAM não tratada apresentou alta toxicidade aguda em *Artemia* sp. ( $\text{CL}_{50} = 18,46\%$ ) e que após o tratamento não houve mortalidade para este organismo. Nos ensaios de fitotoxicidade, houve significativa ( $P < 0,001$ ) inibição do crescimento e redução do número de raízes em *Allium cepa* L. ( $0,31 \pm 0,26$  cm e  $6,3 \pm 6,2$ , respectivamente) expostas à drenagem não tratada, quando comparada à drenagem tratada ( $3,40 \pm 0,95$  e  $33,1 \pm 8,4$ , respectivamente), sugerindo a diminuição do efeito tóxico sobre a planta. A DAM não tratada apresentou alta atividade nucleásica com a redução da forma superenovelada (FI) e conseqüente aumento da forma circular aberta (FII), sendo que após o tratamento, constatou-se que a forma superenovelada permaneceu em altas porcentagens em todas as concentrações e que a forma linear (FIII) apareceu somente nas concentrações mais elevadas, demonstrando diminuição do dano genotóxico. A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que o sedimento calcinado poderia ser utilizado como uma alternativa no tratamento de drenagem ácida de mina de carvão, conferindo uma utilidade econômica ao mesmo e minimizando o seu dano ambiental.

Palavras-chave: drenagem ácida de mina de carvão; sedimento calcinado; pH; metais; toxicidade aguda em *Artemia* sp.; fitotoxicidade em *Allium cepa* L.; atividade de clivagem de DNA plasmidial.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema de corte da molécula de DNA plasmidial.....	31
Figura 2. Fotografia de um gel de agarose demonstrando a separação das formas de DNA plasmidial.....	31
Figura 3. Letalidade (%) de <i>Artemia</i> sp. expostos à drenagem ácida de mina não tratada e tratada com o sedimento calcinado.....	37
Figura 4. Comprimento das raízes (cm) em <i>Allium cepa</i> L. (n=6) expostas por 7 dias, à drenagem não tratada (NT), tratada com sedimento calcinado (TS) e à água mineral comercial como controle negativo (CN). *** Diferença significativa em relação ao TS e CN ( $p < 0,001$ ). Resultados expressos em Média $\pm$ Desvio Padrão.....	40
Figura 5. Número de raízes em <i>Allium cepa</i> L. (n=6) expostas por 7 dias, à drenagem não tratada (NT), tratada com sedimento calcinado (TS) e à água mineral comercial como controle negativo (CN). *** Diferença significativa em relação ao TS e CN ( $p < 0,001$ ). Resultados expressos em Média $\pm$ Desvio Padrão.....	41
Figura 6. Ganho de peso dos bulbos em <i>Allium cepa</i> L. (n=6) expostas por 7 dias, à drenagem não tratada (NT), tratada com sedimento calcinado (TS) e à água mineral comercial como controle negativo (CN). *** Diferença significativa em relação ao TS e CN ( $p < 0,001$ ). Resultados expressos em Média $\pm$ Desvio Padrão.....	42
Figura 7. Formas de DNA Plasmidial exposto à drenagem ácida de mina não tratada.....	44
Figura 8. Formas de DNA Plasmidial exposto drenagem ácida de mina tratada com o sedimento calcinado.....	45

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Principais efeitos nocivos associados aos metais pesados.....	19
Tabela 2. Concentração de metais na drenagem ácida de mina (DAM) não tratada e após o tratamento com o sedimento calcinado.....	35

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Atividades de mineração de carvão e geração de contaminantes ambientais.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Efeitos tóxicos da drenagem ácida de mina de carvão (DAM) em sistemas biológicos.....</b>	<b>17</b>
<b>2.3 Controle da formação de drenagem ácida.....</b>	<b>19</b>
<b>2.3.1 Inundações e vedação de minas subterrâneas.....</b>	<b>19</b>
<b>2.3.2 Armazenamento subaquático de resíduos de mineração.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3.3 Misturas de resíduos minerais.....</b>	<b>20</b>
<b>2.4 Tratamento de drenagem ácida de mina de carvão.....</b>	<b>20</b>
<b>2.4.1 Estratégias de tratamento abiótico.....</b>	<b>20</b>
<b>2.4.2 Estratégias de tratamento biótico.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4.2.1 Processos biológicos.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4.2.2 Sistemas biológicos passivos: zonas úmidas aeróbicas.....</b>	<b>24</b>
<b>2.4.2.3 Sistemas biológicos passivos: zonas úmidas aeróbicas/biorreatores compostos.....</b>	<b>25</b>
<b>2.4.2.4 Sistemas biológicos passivos: zonas úmidas aeróbicas e anaeróbicas.....</b>	<b>26</b>
<b>2.4.2.5 Sistemas biológicos passivos: barreiras reativas permeáveis.....</b>	<b>26</b>
<b>2.4.2.6 Sistemas biológicos passivos: biorreatores oxidantes de ferro.....</b>	<b>26</b>
<b>2.4.2.7 Sistemas biológicos ativos: biorreatores de sulfetogênese.....</b>	<b>27</b>
<b>2.5 Utilização de sedimentos gerados em ETE como alternativa de tratamento de DAM.....</b>	<b>28</b>
<b>2.6 Avaliação da eficácia do tratamento de DAM utilizando parâmetros físico-químicos e bioensaios.....</b>	<b>28</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>32</b>
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>33</b>

4.1 Coleta de drenagem ácida de mina de carvão.....	33
4.2 Coleta e calcinação do sedimento.....	33
4.3 Tratamento da drenagem com o sedimento calcinado.....	33
4.4 Toxicidade aguda em <i>Artemia</i> sp.....	33
4.5 Fitotoxicidade em <i>Allium cepa</i> L.....	34
4.6 Teste de Clivagem de DNA plasmidial <i>in vitro</i> .....	34
4.7 Análise Estatística.....	34
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
5.1 pH e concentração de metais.....	35
5.2 Toxicidade aguda em <i>Artemia</i> sp.....	36
5.3 Fitotoxicidade em <i>Allium cepa</i> L.....	39
5.4 Clivagem de DNA plasmidial <i>in vitro</i> .....	43
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A região Sul de Santa Catarina vem se destacando no cenário mineral brasileiro desde o início do século XX como importante produtor de carvão mineral. Entretanto, esta atividade econômica tem promovido degradação ambiental evidenciada pela poluição do ar e da água, impacto visual, perda de áreas agriculturáveis, assim como a subsidência em zona rural e urbana (MENEZES, LEAL FILHO, 2004).

A atividade mineradora produz vários contaminantes, entre eles encontra-se a Drenagem Ácida de Mina (DAM), que é gerada especialmente pela oxidação de minerais sulfetados. Entre os sulfetos frequentemente encontrados e capazes de produzir a DAM estão a pirita ( $\text{FeS}_2$ ), arsenopirita ( $\text{FeAsS}$ ), calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) e calcocita ( $\text{CuS}_2$ ), sendo a primeira a mais comum. Estas drenagens são caracterizadas pela expressiva acidez ( $\text{pH} < 3,0$ ), alta condutividade e elevadas concentrações de metais como Al, Fe, Mn, Cu, Cd e Zn (CAMPANER; LUIZ-SILVA, 2009).

Um dos efeitos promovido pelas drenagens é o aumento na solubilidade de metais pesados, o que resulta na acumulação destes elementos tóxicos no ambiente, podendo causar a degradação da qualidade de águas superficiais e subterrâneas, pela sua alta capacidade de lixiviação de elementos presentes no minério (CAMPANER; LUIZ-SILVA, 2009). Apresenta ainda, alto potencial de contaminação do solo em áreas que não estão cobertas pelo material sulfetado dos depósitos de rejeitos, o que se dá através da inundação das planícies aluviais dos rios contaminados pela DAM (SCHNEIDER, 2006).

Em organismos aquáticos, a drenagem pode provocar efeitos nocivos, tais como distúrbio respiratório, osmorregulatório, processos mutagênicos e cancerígenos e até a morte da biota, comprometendo a cadeia alimentar, com conseqüente diminuição ou extinção das espécies em virtude dos baixos valores de pH do meio. Tem-se proposto que metais comumente presentes em drenagem são capazes de provocar diversos efeitos fitotóxicos, tais como alterações estruturais, fisiológicas e bioquímicas de membranas, com conseqüentes distúrbios na sua composição, rigidez, fluidez, fluxo de água e de nutrientes; redução de crescimento de tecidos, do diâmetro basal e da biomassa; distúrbios do ciclo celular e da divisão celular; redução do conteúdo de clorofila e distúrbio do processo de fotossíntese; genotoxicidade; indução de estresse oxidativo (GEREMIAS, 2008).

Portanto, as drenagens constituem-se em contaminantes potencialmente capazes de promover profundos efeitos nocivos sobre o ecossistema, havendo a necessidade do seu tratamento, antes de serem lançadas no meio ambiente (GEREMIAS et al., 2008).

Diversos tipos de tratamento de drenagem ácida têm sido propostos e, para tanto, são levados em consideração os volumes gerados, além da análise qualitativa e quantitativa dos contaminantes presentes. Sugere-se que um tratamento efetivo seria aquele capaz de reduzir a sua acidez, bem como, os níveis de metais do meio. Em geral, o tratamento destas drenagens em Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) é feito através de uma pré-correção de pH com agentes alcalinos (ex: CaO e CaCO<sub>3</sub>), com posterior utilização de resinas iônicas, colunas de filtração, processos de adsorção, coagulação, floculação e flotação para remoção de metais (JOHNSON, HALLBERG, 2005; CAMPANER, LUIZ-SILVA, 2009).

Entretanto, na etapa de pré-correção de pH das drenagens em ETE são formados sedimentos (lodo) decorrentes da precipitação de metais, os quais, em muitos casos, não são aproveitados economicamente, sendo depositados no meio ambiente de forma inadequada, vindo a comprometer a qualidade do ambiente de vida, havendo a necessidade de se dar um destino aos mesmos. Neste contexto, a utilização de óxidos obtidos por processo de calcinação de sedimentos oriundos da ETE em empresa de mineração de carvão, poderia ser uma alternativa do tratamento das drenagens, uma vez que estes óxidos têm se mostrado capaz de atuar como adsorvente de H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>, provocando a elevação do pH, com conseqüente precipitação e remoção de metais (GEREMIAS et al., 2008). Desta forma, o emprego destes sedimentos para o tratamento da drenagem poderia ser uma alternativa importante para o seu uso, minimizando os impactos de sua deposição ao meio ambiente.

Para avaliação da toxicidade da drenagem e da eficácia do seu tratamento, além da determinação de parâmetros físico-químicos (ex: metais e pH), pode-se propor testes em organismos bioindicadores. Trabalhos na literatura têm sugerido o uso de microcrustáceos *Artemia* sp. para a avaliação da toxicidade de efluentes industriais, incluindo-se os de elevada acidez e de expressiva concentração de metais. O uso de *Allium cepa* L. (cebola) como organismo bioindicador também têm sido sugeridos para avaliação de ambientes contaminados, podendo ser avaliados vários parâmetros fitotóxicos, tais como: bioacúmulo de contaminantes em diferentes tecidos (raízes, folhas e bulbos); inibição de crescimento tecidual (raízes, folhas e bulbos); efeitos citogenéticos e mutagênicos, entre outros. O potencial genotóxico de contaminantes ambientais também pode ser avaliado *in vitro* pelo seu contato direto com o material genético e, para este propósito, tem-se indicado teste de atividade de clivagem de DNA Plasmidial (SREEDHARA; COWAN, 2001)

Portanto, aliando-se a avaliação de parâmetros físico-químicos com ensaios em organismos bioindicadores, poderia-se ter uma melhor caracterização da drenagem ácida de mina, bem como, uma avaliação mais efetiva do processo de tratamento da mesma, empregando-se o sedimento calcinado como material alternativo.

Neste contexto, é que o presente projeto se propõe a avaliar a toxicidade da drenagem ácida de mina de carvão sobre organismos bioindicadores antes e após o seu tratamento com o sedimento calcinado gerado em Estação de Tratamento de Efluentes.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Atividades de mineração de carvão e geração de contaminantes ambientais

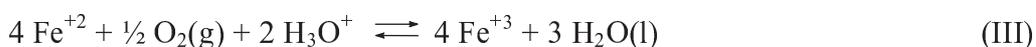
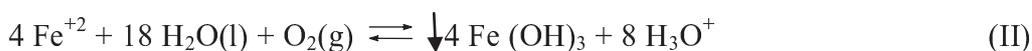
A exploração do carvão mineral caracterizou-se, desde o seu início no século XX, como atividade econômica fundamental ao desenvolvimento de toda a região sul de Santa Catarina (DE LUCA; GASTALDON, 1999; DEFAVERI, 2009; SILVEIRA, 2009).

O Distrito Carbonífero da região sul de Santa Catarina possui 1.850 Km<sup>2</sup> abrangendo os municípios de Orleães, Lauro Müller, Criciúma, Siderópolis, Treviso, Urussanga, Forquilha, Içara, Maracajá e Araranguá (CETEM, 2002).

A exploração do carvão em Santa Catarina é feita em minas subterrâneas e a céu aberto, processos estes que acarretam problemas ambientais, pois modificam a estrutura do meio natural, pela disposição inadequada dos resíduos da mineração, causando contaminação de águas superficiais e subterrâneas, promovendo alterações na atmosfera ao redor das minas pela geração de gases e poeiras e perdas de solo fértil (SANCHEZ; FORMOSO, 1990 apud CAMPOS, M. L., ALMEIDA, J. A., SOUZA, L. S., 2003).

Dentre os contaminantes ambientais provenientes da atividade mineradora encontram-se as drenagens ácidas de minas de carvão (DAM). Na Bacia Carbonífera do Sul de Santa Catarina estão cadastrados cerca de 786 Km de rios atingidos por drenagens ácidas de mina, estas envolvendo as bacias dos Rios Araranguá, Tubarão e Urussanga (SCHINEIDER, 2006).

A DAM caracteriza-se pela expressiva acidez (pH<3,0) e elevada concentração de metais, como Al, Fe, Mn, Cu, Cd e Zn. A acidez da drenagem ácida de mina é principalmente devido à percolação de aquíferos através de sulfetos, um dos quais é a pirita (FeS<sub>2</sub>). Quando exposta ao ar e à água, a pirita é oxidada e dissocia liberando Fe<sup>+2</sup> em solução (I), que podem rapidamente se oxidar a Fe<sup>+3</sup> e precipitar na forma de hidróxidos (II). Depois que a reação 1 começa, um ciclo é desencadeado quando Fe<sup>+2</sup> é oxidado a Fe<sup>+3</sup> (III) e, posteriormente, reduzido pela pirita liberando Fe<sup>+2</sup> e adicional acidez (IV) (GEREMIAS et al. 2008).



Assim, estas drenagens de elevada acidez e ricas em metais constituem em um dos principais poluentes decorrentes da mineração do carvão e capazes de provocar o comprometimento da qualidade ambiental.

## **2.2 Efeitos tóxicos da drenagem ácida de mina de carvão (DAM) em sistemas biológicos**

A DAM é capaz de atingir os mananciais hídricos, comprometendo a sua qualidade com conseqüente promoção de danos às populações de seres vivos que vivem nestes locais, uma vez que, no ambiente aquático, seus metais podem permanecer em solução como íons livres ou na forma de complexos e serem captados pelos seres vivos. Tem-se proposto que ambientes aquáticos cujo pH e as concentrações de metais se encontram em níveis não tolerados, podem causar efeitos deletérios e até mesmo a morte da biota exposta (RIDGE, 1998; BENASSI, 2004 apud GEREMIAS, 2008).

A literatura tem demonstrado toxicidade aguda em microcrustáceos *Artemia* sp. quando exposta à efluentes de mineração de carvão, tendo sido sugerido que seu efeito tóxico estaria relacionado à expressiva acidez ( $\text{pH} < 3,0$ ) e elevada concentração de metais como ferro, alumínio, manganês, cobre, chumbo, arsênio, cádmio e níquel (GEREMIAS, 2008; GEREMIAS et al., 2008).

Em plantas, a exposição a metais como ferro, alumínio e manganês é capaz de provocar o seu bioacúmulo em diferentes tecidos e promover diversos eventos metabólicos, interação com biomoléculas e estruturas celulares, com conseqüentes efeitos fitotóxicos (CLEMENS et al., 2006 apud GEREMIAS, 2008). Dentre os efeitos, pode-se citar: alterações estruturais, fisiológicas e bioquímicas de membranas, com conseqüentes distúrbios na sua composição, rigidez, fluidez, fluxo de água e de nutrientes; redução de crescimento de tecidos (ex: raízes e folhas), do diâmetro basal e da biomassa; distúrbios do ciclo celular e da divisão celular, redução do conteúdo de clorofila e distúrbio do processo de fotossíntese; genotoxicidade entre outros (ARUN et al., 2005; TAMÁS et al., 2006 apud GEREMIAS, 2008).

Em organismos aquáticos, a drenagem pode provocar efeitos nocivos, tais como distúrbio respiratório, osmorregulatório, processos mutagênicos e cancerígenos e até a morte da biota, comprometendo a cadeia alimentar, com conseqüente diminuição ou extinção das espécies em virtude dos baixos valores de pH do meio (GEREMIAS, 2008 apud BORGES, 2009).

Como muitos outros poluentes, a drenagem ácida de mina pode causar uma redução na diversidade e números totais, ou abundância, de macroinvertebrados e também mudança na estrutura de comunidades, por exemplo, uma baixa percentagem. Condições variavelmente degradadas são caracterizadas por dominância de certos representantes taxonômicos de organismos tolerantes à poluição, por exemplo, minhoca-da-terra (*Tubifidae*), larva de mosquito (*Chironomidae*), larva-de-amieiro (*Sialis*), larva de garça azul (*Tipula*), larva-de-verme (*Ptilostomis*), e insetos não bentônicos predadores, como besouros de mergulho (*Dytiscidae*) e barqueiros água (*Corixidae*) (NICHOLS e BULOW, 1973; ROBACK e RICHARDSON, 1969; PARSONS, 1968 apud PENNSYLVANIA, 1998).

Em estudos de avaliação da biodiversidade realizada no Rio Vascão (cinturão sul da mineração Ibérica, próximo a uma mina de rejeitos piritosos de cobre e ferro), em região não contaminada foi observada 43 táxons no total, dos quais 37% pertenciam às ordens Ephemeroptera e Trichoptera. Entretanto, em locais impactados pela DAM cujo valor de pH era de 3,39, além da presença elevada concentração de metais, estas ordens estavam significativamente diminuídas. Este perfil demonstra que a DAM é um contaminante ambiental com efeitos negativos sobre os organismos, afetando as populações dos ambientes aquáticos que se localizam principalmente próximos de áreas mineradas (GERHARDT, A., JANSSENS DE BISTHOVEN, L., SOARES, A.M.V.M., 2004).

Drenagens ricas em metais também estão envolvidas na geração de espécie reativas (ERO's) de oxigênio e conseqüente danos oxidativos tais como carbonilação de proteínas, peroxidação lipídica, fragmentação de DNA e até morte celular (WINSTON e DI GIULIO, 1991 apud J. C. BENASSI et al., 2006).

Os metais pesados lançados no solo ou corpos d'água podem se tornar persistentes no meio ambiente. A forma livre ou iônica é indesejada pela possibilidade de ser incorporada à cadeia alimentar por meio de fontes de consumo humano. A exposição a metais também é capaz de promover efeitos sobre a saúde humana, e dentre os mesmos encontram-se os propostos por Larson e Weincek (1994) (QUEIROZ, 2006), os quais estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Principais efeitos nocivos associados aos metais pesados (LARSON e WEINCK, 1994, apud QUEIROZ, 2006).

<b>Metal Pesado</b>	<b>Efeitos Nocivos</b>
Arsênio	A intoxicação crônica provoca a formação de feridas, gangrena, câncer de pele e danos em órgãos vitais
Cádmio	Disfunção renal, efisema pulmonar e osteoporose
Chumbo	Afeta o metabolismo do cálcio, inibindo sistemas enzimáticos e alterações neurológicas
Cobre	Vômitos, hipotensão, icterícia, coma e morte
Cromo	Carcinogênico na forma hexavalente
Manganês	Lesões cerebrais, danos aos testículos e impotência
Merúrio	Lesões cerebrais
Zinco	Adstringência e coloração empalidecida (acima de $3\mu\text{g.mL}^{-1}$ )

Portanto, o potencial tóxico apresentado pelas drenagens ácidas de mina de carvão indica a necessidade da prevenção de sua formação ou o seu tratamento antes de serem lançadas ao meio ambiente.

### **2.3 Controle da formação de drenagem ácida**

O controle de formação DAM pode ser efetuado por diferentes processos, cujos principais serão descritos a seguir.

#### **2.3.1 Inundações e vedação de minas subterrâneas**

Na medida em que tanto o oxigênio e a água são necessários para perpetuar a formação da DAM, segue-se que, excluindo qualquer um (ou ambos) destes, pode ser possível

para evitar ou minimizar a produção de drenagem ácida. Uma maneira pela qual isso pode ser alcançado é por inundações e vedação de minas profundas abandonadas. O oxigênio dissolvido (OD) presente na água da inundação será consumido pela oxidação mineral (e outros), por microorganismos presentes, e o reabastecimento de OD por transferência de massa e difusão será impedido por meio da selagem da mina. No entanto, isso só é eficaz quando é conhecida a localização de todos os poços e galerias e onde fluxo de oxigênio não ocorre (JOHNSON, D. B. e HALLBERG, K. B., 2005).

### **2.3.2 Armazenamento subaquático de resíduos de mineração**

O armazenamento subaquático também tem sido utilizado para escoamento e armazenamento de rejeitos de minas que são potencialmente produtores de ácidos. Coberturas de águas rasas podem ser utilizadas, e sua eficácia pode ser melhorada através da cobertura dos rejeitos com uma camada de sedimentos ou matéria orgânica, que tem a dupla vantagem de limitar a entrada de oxigênio e oferecer alguma proteção contra a ressuspensão dos rejeitos devido às ações do vento e das ondas. Coberturas secas utilizadas para o armazenamento de superfície de despejos minerais reativos também podem incorporar uma camada orgânica, que normalmente é construída a partir da argila (LI et al. 1997; SWANSON et al., 1997 apud JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B., 2005).

### **2.3.3 Misturas de resíduos minerais**

Outra abordagem sugerida para minimizar da produção de DAM é misturar materiais geradores de ácidos e materiais consumidores de ácidos, produzindo compostos ambientalmente benignos. Uma variação sobre este tema é a adição de fosfatos em fase sólida (tal como apatita) para resíduos piritosos de mina, a fim de precipitar o ferro (III) na forma de fosfato de ferro, reduzindo o seu potencial para atuar como um oxidante de sulfetos. No entanto, a inibição da oxidação da pirita utilizando esta abordagem pode ser apenas temporária, devido ao processo de "blindagem" dos minerais de fosfato adicionados (MEHLING et al., 1997; EVANGELOU, 1998 apud JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B., 2005).

A aplicação de fosfato solúvel (juntamente com peróxido de hidrogênio) é uma das tecnologias de "revestimento" que tem sido desenvolvido por Evangelou e colaboradores (1998). O peróxido oxida a pirita, produzindo ferro férrico, que reage com o fosfato para

produzir uma superfície de revestimento protetora do fosfato férrico. Uma técnica alternativa que envolve a formação de um óxido de ferro/revestimento de sílica sobre superfícies piríticas também tem sido descrita (EVANGELOU, 1998 apud JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B., 2005).

Bactérias litotróficas (“comedores de rocha”), que atuam como oxidantes de ferro e enxofre têm um papel central na geração de DAM. Neste contexto, vários testes em escala de laboratório e de campo utilizando biocidas foram realizados para inibir suas atividades em espólios minerais e rejeitos. Para tanto, pode ser utilizado tensoativos aniônicos, como dodecil sulfato de sódio (SDS), que são altamente tóxicos para este grupo de microrganismos (JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B., 2005).

Dadas às dificuldades práticas que implicaria na inibição da formação de DAM na fonte, muitas vezes, a única alternativa é minimizar o impacto que esta água poluente tem sobre rios e córregos receptores, e mais amplamente sobre o meio ambiente, sendo que tal abordagem envolve medidas de “controle migratório” que pode ser dividido em processos ativos e passivos. O processo ativo refere-se à aplicação contínua de materiais alcalinos para neutralizar as águas ácidas e precipitar os metais, sendo que o processo passivo está relacionado ao uso de ecossistemas naturais e zonas úmidas construídas. Os sistemas passivos têm a vantagem de exigir relativamente pouca manutenção (e custos recorrentes) do que os sistemas ativos, apesar de eles serem caros e/ou impraticáveis para construir em primeiro lugar. Na realidade, todas as tecnologias de tratamento passivo exigem certo valor de custo de manutenção (JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B., 2005).

## **2.4 Tratamento de drenagem ácida de mina de carvão**

Para o tratamento de DAM podem ser empregadas estratégias abióticas e bióticas, cujos fundamentos básicos serão descritos a seguir.

### **2.4.1 Estratégias de tratamento abiótico**

As estratégias abióticas de tratamento de DAM compreendem o uso de tecnologias ativas e passivas.

Em relação às tecnologias ativas, o método mais amplamente utilizado para atenuar os efluentes ácidos é um processo de tratamento ativo envolvendo adição de um agente químico de neutralização (COULTON et al. 2003b apud JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B.,

2005). A adição de um material alcalino à DAM irá aumentar o seu pH, acelerar a taxa de oxidação química do ferro ferroso e levar muitos dos metais presentes em solução a precipitar como hidróxidos e carbonatos. O resultado é a produção de um lodo rico em ferro que também pode conter vários outros metais, dependendo da química da água de mina tratada. Vários reagentes de neutralização têm sido utilizados, incluindo cal (óxido de cálcio), cal hidratada, carbonato de cálcio, carbonato de sódio, hidróxido de sódio e óxido e hidróxido de magnésio. Embora o tratamento químico ativo possa proporcionar efetiva reparação da DAM, tem as desvantagens dos elevados custos de exploração e problemas com a eliminação dos grandes volumes de lama que são produzidos (JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B., 2005).

O tratamento químico ativo é, em seu conceito básico, uma abordagem de baixa tecnologia para remediação de DAM. Neste sentido, tem havido uma série de aperfeiçoamentos que visam melhorar a eficiência do processo e reduzir os problemas associados com os grandes volumes de lodo produzidos. Por exemplo, adições múltiplas intensificadas de reagentes, acompanhada pelo controle do pH podem resultar na remoção seletiva de alguns componentes da DAM, como arsênio e molibdênio (AUBE e PAYANT, 1997 apud JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B., 2005). Vários reagentes floculantes podem ser utilizados para promover a agregação de precipitados, contribuindo assim para a sua eliminação em lagoas de decantação. O lodo rico em ferro produzido pela adição de álcalis é muito volumoso e rico em água, geralmente contendo apenas 2-4% de sólidos. Modificações da técnica envolvendo a reciclagem parcial de lamas dentro de tanques de retenção de cal podem produzir um lodo que contém cerca de 20% de sólidos, o que melhora cerca de 50% de sólidos na desidratação, formando uma "lama de alta densidade". A principal vantagem de um processo de "lama de alta densidade" é que os custos de escoamento e armazenamento do produto final são muito reduzidos (COULTON et al., 2003a apud JOHNSON D. B.; HALLBERG, K. B., 2005).

Em relação às tecnologias passivas, uma abordagem alternativa para a adição de alcalinidade à DAM é o uso de drenos de calcário anóxico (do inglês, *Anoxic Limestone Drain* - "ALD"). O objetivo com estes sistemas é adicionar álcalis à DAM, mantendo o ferro em sua forma reduzida para evitar a oxidação do ferro ferroso e precipitação de hidróxido férrico sobre a pedra calcária ("blindagem"), que de outra forma reduz severamente a eficácia do agente de neutralização. Na medida em que, em teoria, as ALD's requerem uma manutenção mínima, uma vez construída, o seu uso é considerado uma atitude passiva para o tratamento de água de mina. Em uma ALD, a água de mina é obrigada a fluir através de um leito de cascalho de pedra calcária no âmbito de um dreno que é impermeável ao ar e à água

(geralmente construídos de um forro de fundo de plástico e uma cobertura de argila). Problemas também ocorrem quando ALD's são usadas para tratar as águas gaseificadas de mina. A passagem da DAM por meio de uma lagoa anóxica antes da drenagem de calcário anóxico pode ser necessária para reduzir as concentrações de oxigênio dissolvido para os níveis necessários para evitar a oxidação do ferro. Outra possível desvantagem é que a formação de carbonatos de ferro e manganês em géis de carbonato dentro de ALD's pode causar a dissolução incongruente do cascalho de calcário (KLEINMANN et al., 1998; EVANGELOU, 1998 apud JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B., 2005).

## **2.4.2 Estratégias de tratamento biótico**

As estratégias de tratamento biótico compreendem diferentes processos, sendo os principais descritos a seguir.

### **2.4.2.1 Processos biológicos**

A base da bioremediação de DAM deriva da capacidade de alguns microorganismos para gerar alcalinidade e imobilizar metais, assim, essencialmente, revertendo as reações responsáveis pela origem da DAM. Embora nas zonas úmidas aeróbicas construídas para o tratamento aeróbio de DAM, macrófitas, tais como *Phragmites* spp. e *Typha* spp. são as formas mais evidentes de vida atual e suas funções diretas na melhoria da qualidade da água tem sido questionada (JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B., 2002 apud JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B., 2005).

Processos microbiológicos que geram alcalinidade são, na sua maioria, redutores de processos, e inclui a desnitrificação, metanogênese, redução do sulfato, e redução de ferro e manganês. Amonificação (a produção de amônia a partir de compostos contendo nitrogênio orgânico) também é um processo de geração de álcalis. Devido à relativa escassez dos materiais necessários (por exemplo, nitrato), alguns destes processos tendem a ter menor importância em ambientes impactados por DAM. No entanto, na medida em que tanto o ferro férrico e o sulfato tendem a ser muito abundante em DAM, a gênese de álcalis resultantes da redução dessas duas espécies potenciais tem um significado potencialmente importante em águas impactadas pela DAM. Microorganismos fotossintéticos, por consumir uma base fraca (bicarbonato) e produzindo uma base forte (íons hidroxila), também geram alcalinidade líquida (JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B., 2005).

Embora a redução do ferro solúvel não diminua a acidez da solução, a redução da fase sólida (cristalina e amorfa) produz compostos de ferro férrico. As bactérias que catalisam a redução de sulfato a sulfeto geram alcalinidade, transformando um ácido forte (sulfúrico) em um ácido relativamente fraco (sulfeto de hidrogênio,  $H_2S$ ). Além do efeito benéfico sobre a DAM provocado pelo conseqüente aumento do pH, a redução do sulfato é um importante mecanismo para a remoção de metais tóxicos da DAM, uma vez que formam sulfetos de metais altamente insolúveis (JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B., 2005).

A oxidação biológica do ferro ferroso para férrico (que é altamente insolúvel em pH acima de 2,5) é o processo de outra grande imobilização de metais que ocorre em zonas úmidas e bioreatores aeróbios (JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B., 2005).

A maioria das opções de bioremediação para DAM são sistemas passivos, e destes, apenas compostos construídos em terras úmidas e bioreatores têm sido utilizados em sistemas de tratamento em larga escala. As principais vantagens dos sistemas passivos de bioremediação são os seus custos de manutenção relativamente baixos e o fato de que o produto do tratamento da água em fase sólida é retido dentro de sedimentos de zonas úmidas. Em contrapartida, eles são relativamente caros para instalar e podem exigir mais terras do que é disponível ou adequado. Além disso, seu desempenho é menos previsível do que os sistemas de tratamento químico, o destino em longo prazo e a estabilidade dos depósitos que acumulam dentro deles é incerto (JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B., 2002 apud JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B., 2005).

#### **2.4.2.2 Sistemas biológicos passivos: zonas úmidas aeróbicas**

Zonas úmidas aeróbicas são geralmente construídas para tratar águas de minas. Se houver alcalinidade insuficiente na água de mina para evitar uma queda significativa no pH, isto pode ser alterado por incorporação de, por exemplo, um dreno anóxico de calcário. A fim de manter condições oxidantes, as zonas úmidas aeróbicas são sistemas relativamente rasos que operam por escoamento superficial. Macrófitas são plantadas utilizadas para regular o fluxo de água e para filtrar e estabilizar o acúmulo de precipitados de ferro. Este sistema também fornece superfície adicional para a precipitação de fase sólida, para compostos de ferro e minerais (JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B., 2005).

Um segundo maior processo corretivo que ocorre em zonas úmidas aeróbicas receptoras de DAM é a remoção de arsênio, proveniente, principalmente, da dissolução oxidativa da arsenopirita ( $FeAsS$ ) presente em materiais de resíduos de minas. O arsênio

solúvel, que está presente principalmente na forma aniônica como  $\text{AsO}_4^{-3}$  nas águas de minas, pode ser removido por adsorção a colóides positivamente carregados, tais como colóide de ferro através da formação de escorodita ( $\text{FeAsO}_4$ ). De maneira interessante, as cepas originais de bactérias *Thiomonas* spp., que oxidam arsênio (III) a arsênio (IV), bem como oxidantes de ferro ferroso e compostos reduzidos de enxofre, têm sido isolados de águas de mina (BATTAGLIA-BRUNET et al., 2002; COUPLAND et al., 2003 apud JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B., 2005).

#### **2.4.2.3 Sistemas biológicos passivos: zonas úmidas aeróbicas/biorreatores compostos**

Em comparação às zonas úmidas aeróbicas, as principais reações que ocorrem em bioreatores compostos utilizados para mitigar DAM são anaeróbicas. O termo “bioreator composto” é um termo genérico preferível para descrever tais sistemas, bem como algumas instalações. As reações microbianas catalisadas que ocorrem em bioreatores compostos geram alcalinidade líquida e sulfeto biogênico, e, portanto, estes sistemas podem ser usados para tratar águas de mina, que são ácidas e ricas em metais, tal como a DAM de minas abandonadas. Novamente, em contraste com zonas úmidas aeróbicas, as reações redutoras que ocorrem dentro de zonas úmidas compostas são movidas por elétrons que derivam do composto em si. A escolha dos materiais orgânicos utilizados varia de acordo com a disponibilidade local, bem como a sua eficácia comprovada, embora geralmente, os compostos são preparados através da mistura de materiais relativamente biodegradáveis (por exemplo, esterco de vaca ou cavalo, ou composto de cogumelos) com materiais mais recalcitrantes (por exemplo, serragem, turfa, ou palha). A biodegradação lenta do último se presume a agir como um suprimento em longo prazo de substratos apropriados (e amônio), para bactérias nativas redutoras de ferro e sulfato (do inglês FRB e SRB, respectivamente), que geralmente são consideradas tendo o papel principal na remediação de DAM em biorreatores compostos. Entretanto, poucos são os dados quantitativos sobre a importância relativa da redução do ferro e sulfato nas zonas úmidas compostas e, praticamente, pouco se sabe sobre como a microbiologia desses sistemas muda conforme as idades dos ecossistemas, especialmente no que diz respeito ao fornecimento do substrato. Além de processos mediados biologicamente, a qualidade da DAM em zonas úmidas compostas é melhorada através da filtração de materiais em suspensão e coloidais e por via da adsorção de metais da matriz orgânica (VILE e WIEDER, 1993 apud JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B., 2005).

#### **2.4.2.4 Sistemas biológicos passivos: zonas úmidas aeróbicas e anaeróbicas**

Sistemas de bioremediação passivos, que utilizam uma combinação de zonas úmidas aeróbicas e anaeróbicas, têm sido usados em grande escala para o tratamento de DAM. Um exemplo é o sistema Acid Reduction Using Microbiology (ARUM). Este sistema consiste de duas células de oxidação, dentro das quais o ferro é oxidado e precipita; além destes, a DAM passa primeiramente através de uma cela e, em seguida, através de duas células “ARUM”, dentro das quais, álcalis e sulfetos são gerados. Os materiais orgânicos que promovem a redução do sulfato nas células “ARUM” são originados de macrófitas flutuantes (por exemplo, *Typha latifolia L.*). Os sistemas ARUM têm se mostrado efetivos no tratamento de DAM em altas latitudes e locais subtropicais (KALIN e CHAVES, 2001 apud JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B., 2005).

#### **2.4.2.5 Sistemas biológicos passivos: barreiras reativas permeáveis**

Barreiras reativas permeáveis, do inglês “Permeable reactive barriers (PRBs)”, estão sendo usadas cada vez mais para tratar uma ampla gama de águas subterrâneas poluídas. Aqueles que foram instalados para bioremediar DAM, operam nos mesmos princípios básicos como bioreatores compostos. A construção de BRPs envolve a escavação de uma trincheira ou cova no caminho do fluxo da água subterrânea contaminada, preenchendo o vazio com materiais reativos (uma mistura de sólidos orgânicos e, possivelmente, cascalho de pedra calcária), que são suficientemente permeáveis para permitir o fluxo livre das águas subterrâneas, e da superfície perturbada da paisagem. Processos microbiológicos redutores dentro de BRPs geram alcalinidade (que é favorecida e acrescentada pela dissolução do calcário e/ou minerais básicos) e remoção de metais na forma de sulfetos, hidróxidos e carbonatos (BENNER et. al., 1997; YOUNGER et al., 2003 apud D. B. JOHNSON; K. B. HALLBERG, 2005).

#### **2.4.2.6 Sistemas biológicos passivos: bioreatores oxidantes de ferro**

A oxidação do ferro ferroso a férrico em águas ácidas de mina ( $\text{pH} < 4$ ) é muito acelerada por procariotos ferrooxidantes (bactéria e archaea), muitos dos quais são autotróficos (ou seja, como as plantas verdes, eles fixam o carbono inorgânico e tem um requisito nutricional mínimo). A mais bem estudada destas bactérias é *Acidithiobacillus*

*ferrooxidans*, um acidófilo obrigatório que também oxida uma variedade de compostos reduzidos de enxofre. A taxa do fator limitante na oxidação biológica do ferro é freqüentemente o número de bactérias ferrooxidantes presentes, e vários grupos de pesquisa têm procurado abordar isto através da imobilização de *A. ferrooxidans* em uma matriz sólida, formando a base de reatores de leito fixo ou comutadores biológicos. Pesquisas nesta área têm se concentrado sobre as vantagens percebidas (ou não) de meios de suporte diferentes para as bactérias e se focaram exclusivamente em uma única espécie de ferrooxidante, a *A. ferrooxidans*. Atualmente, sabe-se que existe uma considerável biodiversidade de procariotos ferrooxidantes cada um com diferentes afinidades por ferro ferroso, temperatura e pH ótimo, etc. Seria esperado que diferentes espécies oxidantes de ferro seriam mais apropriadas a algumas situações do que outras, por exemplo, o acidofílico *Thiomonas* spp. acelera moderadamente a oxidação do ferro em águas de mina de pH superior a 3 (LONG et al., 2003, HALLBERG, K. B.; JOHNSON, D. B., 2001 apud JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B., 2005).

#### **2.4.2.7 Sistemas biológicos ativos: biorreatores de sulfetogênese**

Bioreatores de sulfetogênese representam uma abordagem radicalmente diferente para remediação de DAM. Estes sistemas de engenharia têm três vantagens potenciais sobre remediação biológica passiva: o seu desempenho é mais previsível e facilmente controlado; permitem que os metais tóxicos como cobre e zinco, presentes em DAM, sejam seletivamente recuperados e reutilizados; as concentrações de sulfato em águas transformadas podem ser significativamente reduzidas. Em relação às suas desvantagens, a construção e os custos operacionais desses sistemas são consideráveis (JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B., 2005).

Bioreatores de sulfetogênese utilizam a produção biológica de sulfeto de hidrogênio para gerar alcalinidade e remover metais como sulfetos insolúveis, que é um dos processos que ocorrem em bioreatores compostos e BRPs. No entanto, bioreatores de sulfetogênese são construídos e operados para aperfeiçoar a produção de sulfeto de hidrogênio. (JOHNSON, 2000; BOONSTRA et al., 1999 apud JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B., 2005).

## **2.5 Utilização de sedimentos gerados em ETE como alternativa de tratamento de DAM**

O tratamento de drenagem ácida de mina de carvão nas empresas mineradoras da região carbonífera catarinense, em geral, é feito em Estação de Tratamento de Efluentes (ETE), através de uma pré-correção de pH, com posterior remoção de metais. Contudo, estes processos demandam diversas etapas e elevados recursos financeiros, além da geração de sedimentos formados pela precipitação de metais na etapa de alcalinização da drenagem em ETE (GEREMIAS et al., 2008). Estes sedimentos, em muitos casos, não são aproveitados economicamente, sendo depositados no meio ambiente de forma inadequada. Desta forma, faz-se necessária a busca de novas tecnologias de remediação, utilizando-se materiais de baixo custo e com melhor capacidade de remoção dos poluentes (VAN RENSBURG, MORGHENTAL, 2003 apud GEREMIAS, 2008).

Neste contexto, a utilização de óxidos obtidos por processo de calcinação de sedimentos gerados em ETE de empresas de mineração de carvão poderia ser uma alternativa de remediação das drenagens. Tem-se proposto que estes óxidos seriam capazes de atuar como adsorvente de  $H_3O^+$ , provocando a elevação do pH com conseqüente precipitação e remoção de metais, além de adsorverem metais por atração eletrostática e forças dipolo-dipolo, em decorrência da presença de cargas superficiais (GEREMIAS et al., 2008).

Salienta-se que, além de se constituir em um processo de tratamento de pouca complexidade e de baixo custo, o mesmo é capaz de conferir um destino economicamente viável ao sedimento, justificando o seu uso para este fim.

Desta forma, o emprego destes sedimentos para o tratamento da drenagem poderia ser uma alternativa importante para o seu uso, minimizando os impactos de sua deposição ao meio ambiente.

## **2.6 Avaliação da eficácia do tratamento de DAM utilizando parâmetros físico-químicos e bioensaios**

O monitoramento de drenagem ácida, bem como, dos processos propostos para o seu tratamento é de suma importância, para que se tenha uma melhor avaliação dos impactos causados por estes no meio ambiente. Para tanto, pode-se propor a utilização de parâmetros físico-químicos, como análise de metais e medição do pH, uma vez que estes seriam os principais fatores envolvidos na toxicidade do meio (GEREMIAS et al., 2008).

Além da avaliação de parâmetros físico-químicos, faz-se necessário a utilização de ensaios com organismos bioindicadores, os quais respondem rapidamente a qualquer alteração ambiental, como forma de monitorar a qualidade de efluentes e a eficácia do seu tratamento (GEREMIAS et al., 2008). Em geral, os organismos bioindicadores são utilizados em metodologias cujo objetivo é testar a sua sobrevivência, e para este propósito, tem-se indicado teste de toxicidade aguda em microcrustáceos (ex.: *Artemia* sp.) e fitotoxicidade (ex.: *Allium cepa* L.), além de outros organismos como bactérias, fungos e animais (SVENSSON et al., 2005; SAURABH et al., 2005, apud GEREMIAS et al., 2008).

O uso de *Allium cepa* L. (cebola) foi introduzido em 1938 como teste biológico para avaliação dos efeitos citogenéticos da colchicina. Até então a mesma vem sendo utilizada como organismo bioindicador para avaliação ecotoxicológica de ambientes contaminados por várias classes de poluentes, tais como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, pesticidas halogenados, metais pesados, entre outros. Para tanto, tem sido avaliados diversos parâmetros fitotóxicos, tais como, bioacúmulo de contaminantes em diferentes tecidos (raízes, folhas e bulbos), inibição de crescimento de raízes e folhas, efeitos citogenéticos e mutagênicos, entre outros. O uso deste vegetal em testes ecotoxicológicos oferece benefícios como sensibilidade, reprodutibilidade, resposta em breve período de tempo, necessidade de pouco volume de amostra de contaminante, bem como baixo custo. *Allium cepa* L. também tem sido recomendado por agências internacionais de proteção ambiental para avaliação da toxicidade de contaminantes ambientais (RICHA et al., 2005; FATIMA, AHMAD, 2005; MADEJÓN et al., 2006; FISKESJÖ, 2006; FATIMA, AHMAD, 2006; CALZONI et al., 2007; TOMASEVIĆ et al., 2008, apud GEREMIAS, 2008).

Ensaio de letalidade em organismos bioindicadores expostos a contaminantes é um parâmetro drástico de avaliação de toxicidade. Desta forma, o desenvolvimento e uso de biomarcadores, enquanto indicadores de alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas em organismos-teste, vêm ganhando espaço como mecanismo de avaliação de impacto ambiental (STREB et al., 2002 apud GEREMIAS, 2008).

Dentre os biomarcadores, encontram-se os que avaliam a genotoxicidade decorrente da exposição a agentes tóxicos em ambientes aquáticos e, para tanto, tem-se sugerido o uso de teste de atividade de clivagem de DNA plasmidial (SREEDHARA; COWAN, 2001).

Plasmídeos são elementos genéticos extracromossômicos com capacidade de replicação autônoma independente do cromossomo bacteriano, sendo considerados replicons (unidades genéticas de replicação autônoma). A grande maioria dos plasmídeos é formada por moléculas de DNA dupla fita circulares, mas existem também plasmídeos lineares e

plasmídeos integrativos que se posicionam no cromossomo das células. O tamanho destes elementos pode variar de 1 a 1000 Kilobases (Kb) e normalmente não possuem homologia com o cromossomo da célula hospedeira em sua sequência de nucleotídeos (ZAHA, 2003 apud PICH, 2009).

Os plasmídeos podem ser classificados de acordo com a quantidade e as espécies bacterianas que habitam ou de acordo com seus grupos de incompatibilidade. Estes baseiam-se no fato de que plasmídeos diferentes podem estar presentes em uma mesma célula desde que sejam compatíveis. Também podem ser classificados como naturais, que normalmente são encontrados nas bactérias em seus estados selvagem e artificiais, este último via de regra foram produzidos por engenharia genética e possuem características distintas e bem definidas como é o caso do plasmídeo pBSK-II (ZAHA, 2003 apud PICH, 2009).

A metodologia de clivagem de DNA plasmidial é empregada com a finalidade de tornar cepas bacterianas capazes de incorporar facilmente fragmentos de DNA, através de tratamento químico (AUSUBEL et al. 2002 apud PICH, 2009). As células são primeiramente preparadas, e logo depois, transformadas. A transformação tem por objetivo, introduzir o plasmídeo desejado nas bactérias competentes, através do choque térmico. Com esse método obtém-se em placas de petri com meio sólido, colônias de bactérias transformadas com o plasmídeo desejado (PICH, 2009). Após as bactérias serem transformadas com o plasmídeo desejado, é feita a extração de DNA plasmidial. A partir do procedimento de extração, obtém-se normalmente quantidades superiores a 90% de DNA plasmidial intacto, que se mantém em sua forma superenovelada (PICH, 2009).

Quebras na dupla hélice fazem com que a forma superenovelada (FI) transforme-se em circular aberta (FII) através de quebras simples e forma linear (FIII), através de quebra dupla da cadeia, conforme demonstrado na figura 1.

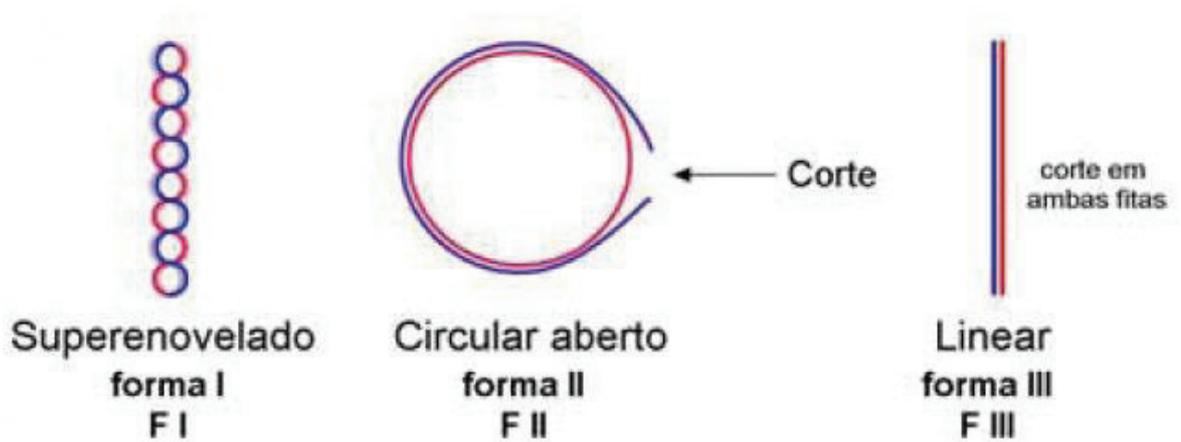


Figura 1. Esquema de corte da molécula de DNA plasmidial. Fonte: modificado de Berg; Tymoczko e Stryer, (2004 apud PICH, 2009)

Todas as três formas possuem velocidades de migração eletroforética diferenciadas, apresentando-se como bandas distintas em géis de eletroforese, como demonstrado na figura 2 (SHREDDHARA e COWAN, 2001 apud PICH, 2009).

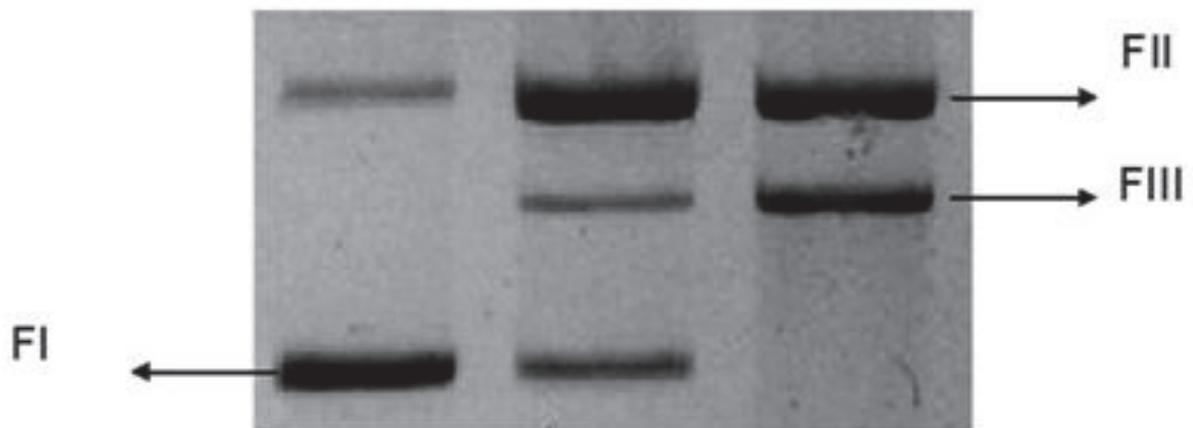


Figura 2. Fotografia de um gel de agarose demonstrando a separação das formas de DNA plasmidial. Fonte: PICH, 2009.

Portanto, a avaliação de parâmetros físico-químicos associado ao uso de ensaios de toxicidade em organismos bioindicadores e de biomarcadores de genotoxicidade contribui de forma expressiva para a caracterização da drenagem ácida de mina, bem como, para a análise da eficácia do seu tratamento utilizando sedimento calcinado como material alternativo.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a toxicidade em organismos bioindicadores expostos à drenagem ácida de mina de carvão antes e após o seu tratamento com sedimentos gerados em Estação de Tratamento de Efluentes submetidos à calcinação.

#### 3.2 Objetivos específicos

- . Caracterizar a drenagem ácida de mina, antes e após seu tratamento com sedimento calcinado, através da determinação do pH e das concentrações dos metais, Al, Fe, Mn, Cu, Cd e Zn;
- . Avaliar a toxicidade aguda em microcrustáceos *Artemia* sp. expostos à drenagem não tratada e após o tratamento com o sedimento calcinado;
- . Avaliar a fitotoxicidade em *Allium cepa* L. exposta à drenagem não tratada e após o tratamento com o sedimento calcinado;
- . Avaliar a genotoxicidade da drenagem não tratada e tratada com o sedimento calcinado através de testes de clivagem de DNA plasmidial *in vitro*;
- . Verificar se o sedimento calcinado é eficaz na elevação do pH, na remoção ou redução de metais da drenagem, bem como na diminuição ou remoção da toxicidade sobre os organismos bioindicadores em estudo.
- . Avaliar a possível utilização de sedimento gerado em Estação de Tratamento de Efluentes como uma alternativa para o tratamento de drenagem ácida de mina de carvão.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Coleta de drenagem ácida de mina de carvão**

Amostras de drenagem ácida de mina de carvão (20L) foram coletadas em frascos de polietileno em Estação de Tratamento de Efluentes de uma empresa de mineração de carvão situada na região sul de SC, sendo resguardada em sigilo a razão social da empresa. As amostras foram armazenadas em condições adequadas até o início dos experimentos.

### **4.2 Coleta e calcinação do sedimento**

Amostras de sedimento (5 kg) foram coletadas em frasco de polietileno em Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) da mesma empresa mineradora. O sedimento foi calcinado em mufla a 800°C por 1h e armazenados em condições adequadas até o início dos experimentos (GEREMIAS et al., 2008).

### **4.3 Tratamento da drenagem com o sedimento calcinado**

Amostras de drenagem foram submetidas ao tratamento com o sedimento calcinado na proporção de 25 ml/g de sedimento, sob agitação, à temperatura ambiente por 24h. Ao final do tratamento, a drenagem foi filtrada, com posterior determinação do pH por potenciometria e das concentrações dos metais Al, Fe, Mn, Cu, Cd e Zn por Espectrometria de Absorção Atômica em Chama.

### **4.4 Toxicidade aguda em *Artemia* sp.**

Cistos de microcrustáceos de *Artemia* sp. (50 mg) foram colocados em 100 mL de solução salina a 2%, durante 24 horas, a aproximadamente 37°C, sob aeração e ao abrigo da luz para a eclosão em náupilos. Os náupilos (n=10, em quadruplicatas) foram expostos a 2 ml de diluições seriadas de drenagem não tratada e tratada com o sedimento calcinado, em placas “*multiwel*”, por 24 horas, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Foi utilizada solução salina à 2% como controle negativo. Ao final da exposição foi determinada a concentração letal média (CL<sub>50</sub>), definida como a concentração na qual ocorre a mortalidade em 50% dos organismos bioindicadores (SVENSSON et al., 2005) e, para tanto, foi empregado o método

matemático *Trimmed Spearman-Kärber*, utilizando-se programa Probitos® (GEREMIAS, 2008).

#### 4.5 Fitotoxicidade em *Allium cepa* L.

*Allium cepa* L. (n=6) tiveram suas raízes envelhecidas retiradas com bisturi e determinado o peso dos bulbos. Posteriormente, os bulbos foram expostos à 50 mL de drenagem não tratada e tratada com sedimento calcinado, em tubos falcon, por 7 dias, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Foi utilizada água mineral como controle negativo. Após a exposição foi avaliado a fitotoxicidade, através da determinação do número de raízes, comprimento das raízes e ganho de peso do bulbo (BORTOLOTTO et al., 2009).

#### 4.6 Teste de Clivagem de DNA plasmidial *in vitro*

Células de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  foram transformadas com o plasmídeo pBSK-II pela técnica descrita por Sreedhara e Cowan (2001). O DNA plasmidial foi purificado, conforme metodologia descrita por Ausubel (2002) apud PICH (2009), e o DNA plasmidial intacto, na forma supertorcida (FI), foi incubado por 16h, a 37°C em tampão HEPES (200 mM), com concentrações seriadas da drenagem não tratada e após o tratamento com o sedimento calcinado. Após a incubação, foi adicionado o tampão de eletroforese para a interrupção das reações, sendo estas aplicadas em gel de agarose com brometo de etídio e submetidas à eletroforese horizontal com tampão TBE 0,5x por 50min a 50V. Após a corrida, o gel contendo as bandas com as formas do DNA plasmidial foram visualizadas com o auxílio de transluminador ( $\lambda = 302\text{nm}$ ), fotodocumentadas e quantificadas por meio do *Software Scion Image 5.0* (Scion Corporation, MD, USA). A avaliação da atividade de clivagem do DNA foi analisada pela obtenção de formas alternativas de DNA, a saber: quebra simples (FII) e quebra dupla (FIII).

#### 4.7 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados obtidos na avaliação da fitotoxicidade em *Allium cepa* L. foi efetuada através de Análise de Variância (ANOVA), completada pelos testes de *Student-Newman-Keuse* e *Dunnet*, quando necessário. Para tanto, foi utilizado o software

INSTAT (GrahPad, San Diego, CA, USA), admitindo-se um nível de significância de  $P < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 pH e concentração de metais

Os resultados obtidos dos valores de pH permitem demonstrar que a drenagem não tratada apresentou expressiva acidez ( $\text{pH} = 2,81$ ), sendo que o tratamento com o sedimento calcinado foi eficaz na redução deste parâmetro, uma vez que promoveu a elevação do pH para 7,29. Em relação à análise de metais, os resultados mostram que a drenagem não tratada apresentou elevada concentração de ferro, alumínio e manganês, sendo que após o tratamento com o sedimento calcinado, houve expressiva remoção dos metais, conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2. Concentração de metais na drenagem ácida de mina (DAM) não tratada e após o tratamento com o sedimento calcinado

Metais	DAM não tratada ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	DAM tratada ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
Al	120,2	0,4
Cd	<0,01	<0,01
Cu	0,12	0,05
Fe	145,96	0,32
Mn	22,09	0,88
Zn	2,86	0,02

Estes resultados estão consistentes com os obtidos por Geremias e colaboradores (2008) que constataram acidez ( $\text{pH} = 2,8$ ) e presença dos metais majoritários alumínio ( $30,6 \text{ mg. L}^{-1}$ ), ferro ( $15,88 \text{ mg L}^{-1}$ ), manganês ( $11,43 \text{ mg. L}^{-1}$ ), zinco ( $1,20 \text{ mg. L}^{-1}$ ) e cobre ( $0,2 \text{ mg. L}^{-1}$ ) em drenagem ácida de mina de carvão, os quais foram efetivamente removidos após o tratamento com rejeito piritoso calcinado principalmente em função da elevação do pH (de 2,8 para 7,8).

A elevada concentração de metais nas drenagens é decorrente da associação dos mesmos em minerais sulfetados. O contato da drenagem com estes minerais é capaz de solubilizar e lixiviar os metais, em virtude dos baixos valores de pH do meio, com

consequente elevação da concentração dos mesmos na drenagem (SASOWSKY et al., 2000 apud BORGES, 2009).

A remoção dos metais da drenagem após o tratamento com o sedimento calcinado poderia ser decorrente da presença de óxidos de metais, os quais seriam capazes de atuar como adsorventes de  $H_3O^+$ , provocando o aumento do pH, com conseqüente precipitação e remoção dos metais em solução, além da remoção dos metais pela adsorção dos mesmos na superfície destes óxidos (GEREMIAS, 2008; GEREMIAS et al., 2008; BORGES, 2009).

Cabe ressaltar que o tratamento da drenagem com o sedimento promoveu expressiva remoção de manganês a um pH próximo da neutralidade, o que, em geral, não ocorre com os tratamentos convencionais, os quais necessitam elevar o pH para valores superiores a 8,0 para que se possa remover este metal.

Portanto, além de dar um destino econômico ao sedimento, o seu uso no tratamento das drenagens ácidas poderia servir como alternativa para reduzir os impactos causados por estas no meio ambiente e nas populações de diversos organismos aquáticos.

## **5.2 Toxicidade aguda em *Artemia* sp.**

Os resultados obtidos no teste em *Artemia* sp. (figura 3) permitem demonstrar que a drenagem não tratada apresentou alta toxicidade aguda para o organismo bioindicador utilizado, apresentando  $CL_{50} = 18,46\%$ . Após o tratamento com o sedimento calcinado, foi constatado que não houve mortalidade dos indivíduos expostos em todas as concentrações da drenagem, não sendo possível a determinação da  $CL_{50}$ .

O efeito tóxico observado na drenagem não tratada poderia estar associado à elevada acidez e aos metais presentes em solução, os quais foram removidos após o tratamento com o sedimento calcinado e conseqüente eliminação da toxicidade sobre o organismo bioindicador.

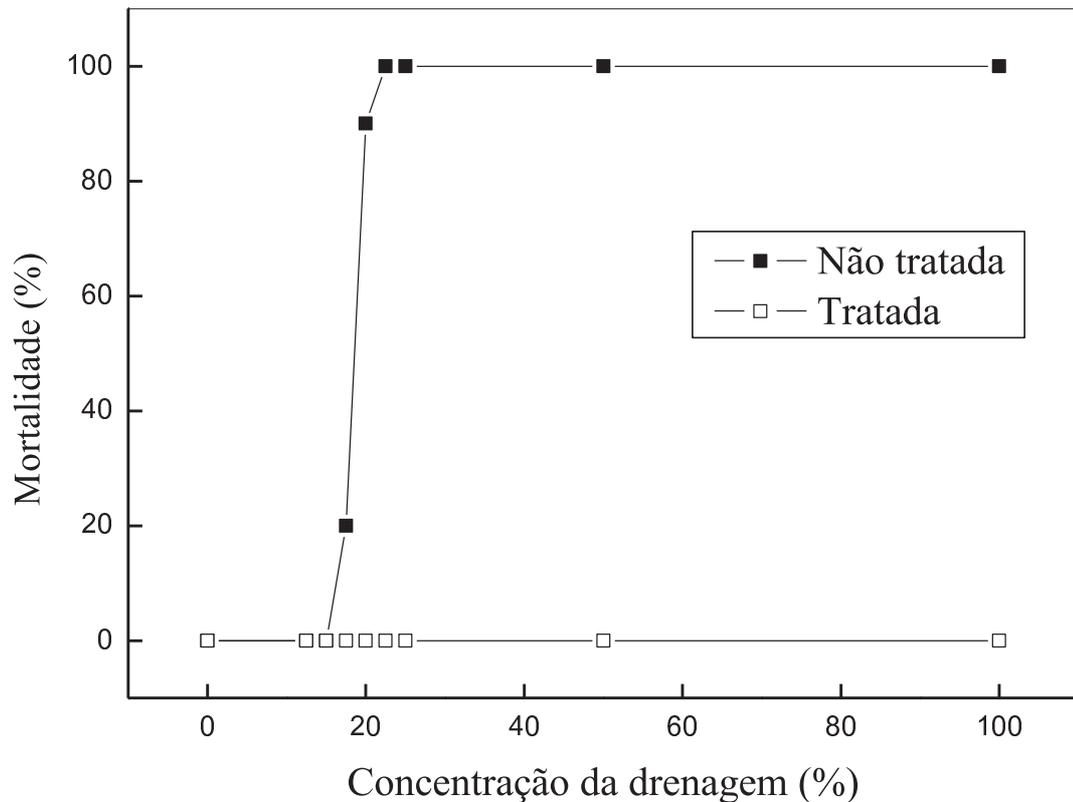


Figura 3. Letalidade (%) de *Artemia* sp. expostos à drenagem ácida de mina não tratada e tratada com o sedimento calcinado

Trabalhos na literatura também têm descrito o uso de *Artemia* sp. para avaliação dos efeitos tóxicos de contaminantes da mineração do carvão e seu tratamento.

Defaveri e colaboradores (2009) utilizaram *Artemia* sp. como organismo bioindicador para avaliar a eficiência do biopolimento de drenagem ácida de mina. Para tanto, coletaram amostras de drenagem em 4 pontos (Ponto 1= antes do polimento; Pontos 2 e 3= durante o polimento; Ponto 4= após o polimento). *Artemia* sp. foram expostos em diferentes concentrações das amostras (50, 75, 90 e 100%), sendo determinada a  $CL_{50}$ . Eles observaram que houve mortalidade dos indivíduos apenas em concentração de drenagem acima de 90%, e constataram que o Ponto 1 apresentou a maior letalidade, seguido dos Pontos 2 e 3, sendo que o Ponto 4 não apresentou toxicidade sobre o bioindicador. A partir dos resultados obtidos, foi sugerido que o tratamento do efluente por biopolimento foi eficiente na diminuição da toxicidade aguda sobre o microcrustáceo *Artemia* sp. (BORGES, 2009).

Borges (2009), avaliando a toxicidade de águas da Bacia Hidrográfica do Rio Urussanga não remediadas e remediadas com rejeito de mineração de carvão, coletadas em 3

pontos (Ponto 1= Início da Bacia Hidrográfica – Município de Urussanga; Ponto 2= Intermédio da Bacia Hidrográfica – Localidade de Esplanada – Município de Morro da Fumaça; Ponto 3= Estuário do Rio Urussanga – Ponto final da Bacia – Comunidade de Torneiro - Município de Jaguaruna), utilizando como bioindicador *Artemia* sp., verificou expressiva mortalidade em *Artemia* sp. ( $CL_{50}$ = 2,34%), expostas às águas da bacia não remediadas sugerindo que as águas do Ponto 1 se mostraram mais tóxicas, possivelmente devido à sua maior aproximação de áreas de mineração de carvão.

Geremias e colaboradores (2008), ao avaliarem o uso de microesferas de quitosana na remoção de acidez e íons de metais, observaram expressiva toxicidade em *Artemia* sp. ( $CL_{50}$ = 4,97%) exposta à drenagem ácida de mineração de carvão, a qual apresentava elevada acidez ( $pH=2,6$ ) e expressiva concentração de metais Al, Fe e Mn. Eles constataram que o tratamento da drenagem utilizando o rejeito de mineração calcinado promoveu a remoção da toxicidade sobre o organismo bioindicador. Os autores sugeriram que a capacidade do rejeito em remover a toxicidade estaria relacionada à presença de óxidos de metais (ex:  $SiO_2$ ,  $Al_2O_3$  e  $Fe_2O_3$ ) em sua composição. Estes óxidos seriam capazes de atuar como adsorvente de  $H_3O^+$ , provocando a elevação do pH, com conseqüente precipitação e remoção de metais, além de adsorverem metais por adsorção química e física, através de mecanismos de interação por complexação, formação de pares iônicos, troca iônica, eletrostáticas e de *van der Waals*, entre outros (BORGES, 2009).

Avaliando o biopolimento de drenagem ácida de mina, Madeira e colaboradores (2009) verificaram que na avaliação da toxicidade aguda em *Artemia* sp. nenhum ponto apresentou letalidade expressiva, atingindo no máximo 30% na concentração de 100% de DAM no ponto 1.

Em estudo realizado na região carbonífera de Criciúma/SC, também foi constatado expressiva mortalidade em *Artemia* sp. exposta a drenagem ácida de mina ( $CL_{50}$ = 3,1%), a efluentes de infiltração de bacias de decantação ( $CL_{50}$ = 6,7%), bem como às águas de rios atingidas pelos efluentes de mineração de carvão ( $CL_{50}$ = 2,5%). Foi sugeriram que a toxicidade estaria sendo provocada pela presença de metais pesados como Zn, Fe, Mn, Cu e Pb (GEREMIAS et al., 2003 apud BORGES, 2009).

Outros autores também observaram expressiva toxicidade aguda em *Artemia* sp. quando expostos à drenagem ácida de mina, devido à elevada acidez ( $pH \leq 3,0$ ) e à presença dos metais Fe, Mn, Zn, Cu e Pb (GEREMIAS et al., 2003 apud GEREMIAS et al., 2008).

Também tem sido relatada na literatura a toxicidade de metais sobre *Artemia* sp. e outros microcrustáceos, podendo-se citar o de Hadjispyrou e colaboradores (2001), que

observaram mortalidade em *Artemia franciscana* quando expostas à solução de cádmio e cromo hexavalente.

Portanto, a partir dos resultados obtidos, pode-se sugerir que o tratamento da drenagem com o sedimento calcinado foi eficiente na remoção da toxicidade aguda em *Artemia* sp.

### **5.3 Fitotoxicidade em *Allium cepa* L.**

No teste de fitotoxicidade em *Allium cepa* L. exposta à drenagem ácida de mina não tratada e tratada com o sedimento calcinado, foram avaliados os parâmetros de crescimento de raízes, número de raízes e ganho de peso dos bulbos.

Os resultados obtidos da análise do crescimento de raízes (Figura 4) permitem demonstrar que a drenagem não tratada provocou expressiva inibição do seu crescimento e esta foi considerada extremamente significativa, quando comparado com o controle negativo (água mineral) e ao tratamento com o sedimento calcinado.

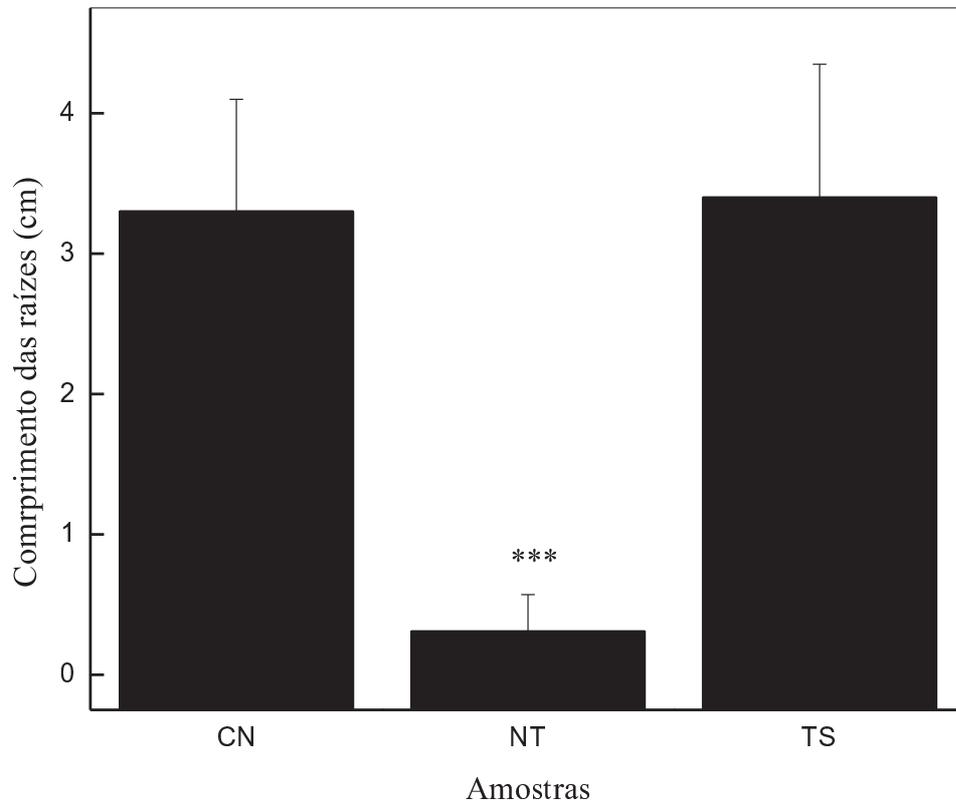


Figura 4. Comprimento das raízes (cm) em *Allium cepa L.* (n=6) expostas por 7 dias, à drenagem não tratada (NT), tratada com sedimento calcinado (TS) e à água mineral comercial como controle negativo (CN). \*\*\* Diferença significativa em relação ao TS e CN ( $p < 0,001$ ). Resultados expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão

Em relação ao número de raízes (figura 5), também foi observado que houve expressiva redução nas cebolas expostas à drenagem não tratada, quando comparado com o controle negativo e ao grupo tratado com o sedimento calcinado.

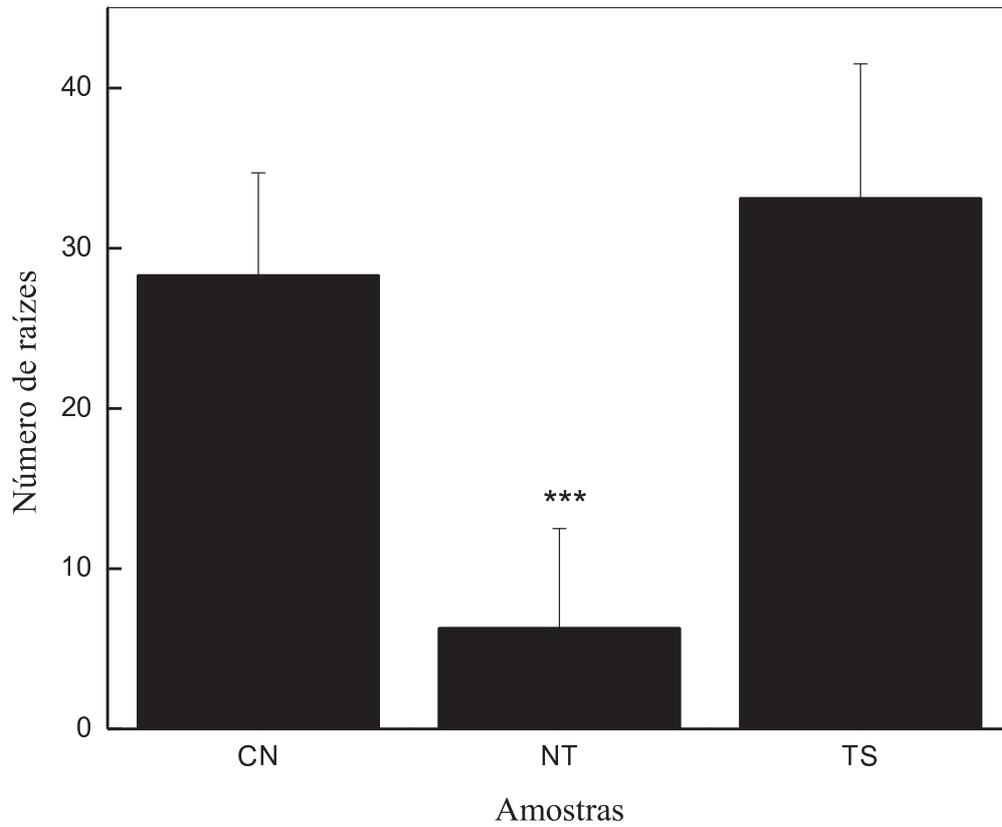


Figura 5. Número de raízes em *Allium cepa L.* (n=6) expostas por 7 dias, à drenagem não tratada (NT), tratada com sedimento calcinado (TS) e à água mineral comercial como controle negativo (CN). \*\*\* Diferença significativa em relação ao TS e CN ( $p < 0,001$ ). Resultados expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão

Quanto ao ganho de peso dos bulbos (figura 6), verificou-se que não houve diferença significativa entre os diferentes grupos.

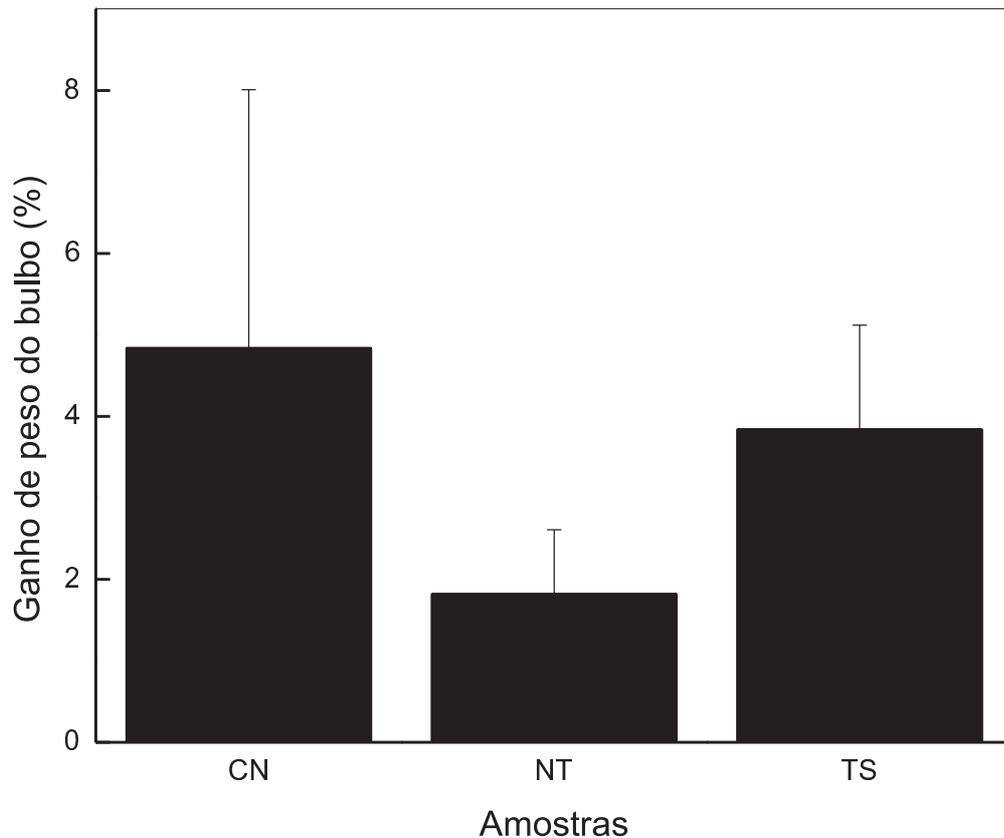


Figura 6. Ganho de peso dos bulbos em *Allium cepa* L. (n=6) expostas por 7 dias, à drenagem não tratada (NT), tratada com sedimento calcinado (TS) e à água mineral comercial como controle negativo (CN). \*\*\* Diferença significativa em relação ao TS e CN ( $p < 0,001$ ). Resultados expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão

Estes resultados permitem sugerir que o tratamento com o sedimento calcinado foi efetivo para a remoção dos parâmetros fitotóxicos de inibição de crescimento das raízes e número de raízes em *Allium cepa* L.

O vegetal *A. cepa* pertence à ordem Liliales e à família Alliaceae (SOUZA; LORENZI, 2005 apud DEFAVERI, 2009). É um organismo amplamente utilizado para testes de monitoramento ambiental (BORTOLOTTO et al, 2009 apud DEFAVERI, 2009).

Geremias et al., (2008) observaram expressiva inibição do crescimento de raízes em *A. cepa* L. (RC50 = 9,21%) quando expostas à efluentes de mineração, sendo que o efluente apresentava elevada acidez (pH = 2,72) e, também, elevada concentração de metais como Fe, Al e Mn.

Em trabalho realizado por Teixeira e colaboradores (2004), foi constatada expressiva inibição do crescimento de raízes de *A. cepa* L. ( $RC_{50} = 25,2\%$ ) expostas a águas de rios da região carbonífera de Criciúma/SC que estavam contaminadas por efluentes de mineração de carvão.

Bortolotto e colaboradores (2009), ao avaliarem o tratamento de drenagem ácida de mina em banhados biológicos, verificaram expressiva inibição do crescimento de raízes em *Allium cepa* L. expostas à drenagem ácida em concentração de 100%, no entanto esta inibição foi insuficiente registrar uma diferença estatisticamente significativa entre os pontos amostrais de coleta e controle negativo (água mineral) e, conseqüentemente, o efluente não foi considerado tóxico. Apesar disso, uma tendência de aumento na toxicidade na entrada do banhado biológico construído foi observado que retornaram aos baixos valores na saída.

Em trabalho com drenagem ácida de mina de carvão, também foi constatado alto potencial de inibição de crescimento de raiz em *A. cepa* L. gerando inibição de 90% na concentração de 100% de drenagem e inibição de 10% na concentração de 29% da drenagem, quando comparados com o controle negativo. Após o tratamento com microesferas de quitosana, o processo foi revertido, obtendo-se resultados melhores que os expostos ao controle negativo (BENASSI, 2004 apud DEFAVERI, 2009).

Portanto, a inibição de crescimento de raízes e número de raízes em *Allium cepa* L. expostas às drenagens não tratadas observados em nossos resultados poderiam estar associados à acidez e presença de metais no meio, sendo que o tratamento com o sedimento calcinado removeu estes contaminantes com conseqüente eliminação da fitotoxicidade.

#### **5.4 Clivagem de DNA plasmidial *in vitro***

Nos resultados obtidos do Teste de Clivagem de DNA plasmidial, verificou-se alta atividade nucleásica da drenagem não tratada (Figura 7), observando-se que houve uma redução da forma superenovelada (F I) e um conseqüente aumento da forma circular aberta (F II). Na concentração de 12,5% não foi possível visualizar nenhuma forma do DNA plasmidial, pois o mesmo foi totalmente degradado em contato com a drenagem.

Após o tratamento da drenagem com o sedimento calcinado, constatou-se que a forma superenovelada (F I) permaneceu em altas porcentagens em todas as concentrações, sendo que forma linear (F III) apareceu somente nas concentrações mais elevadas (Figura 8).

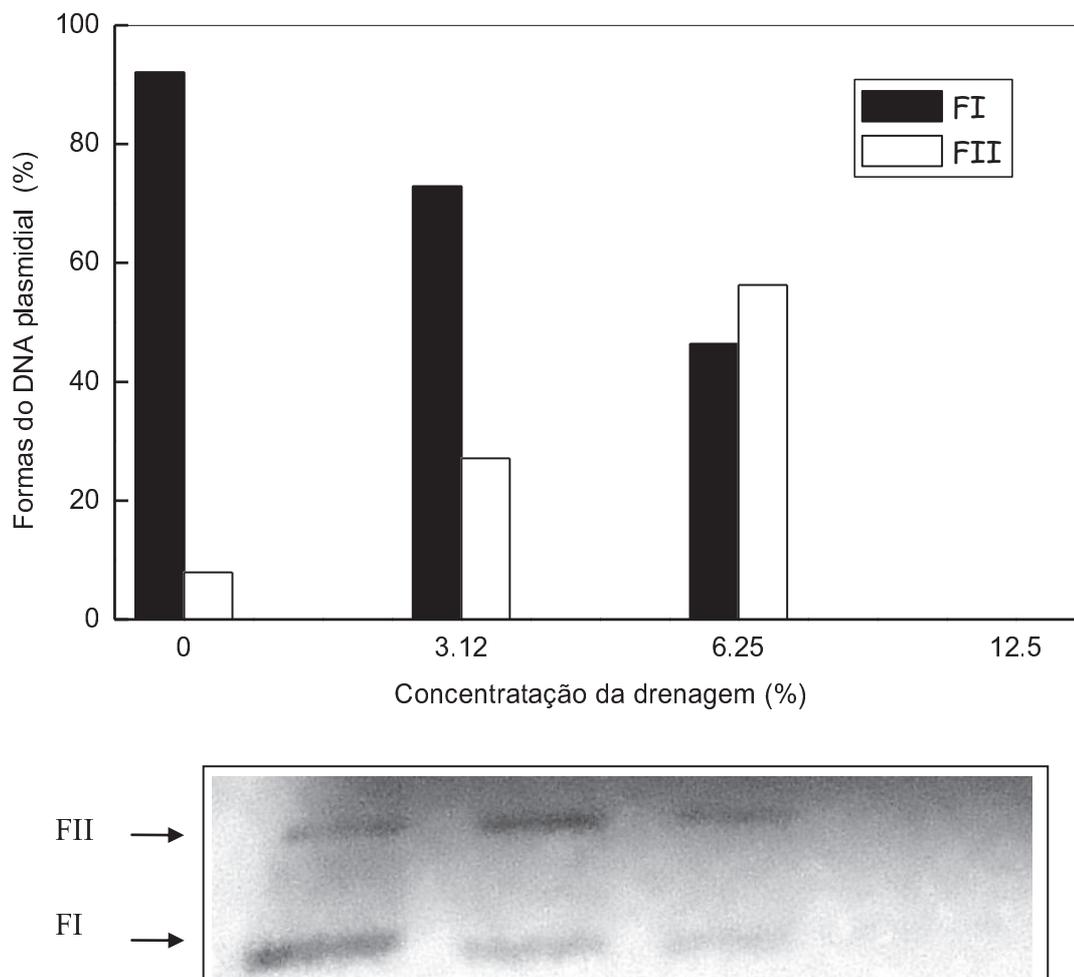


Figura 7. Formas de DNA Plasmidial exposto à drenagem ácida de mina não tratada.

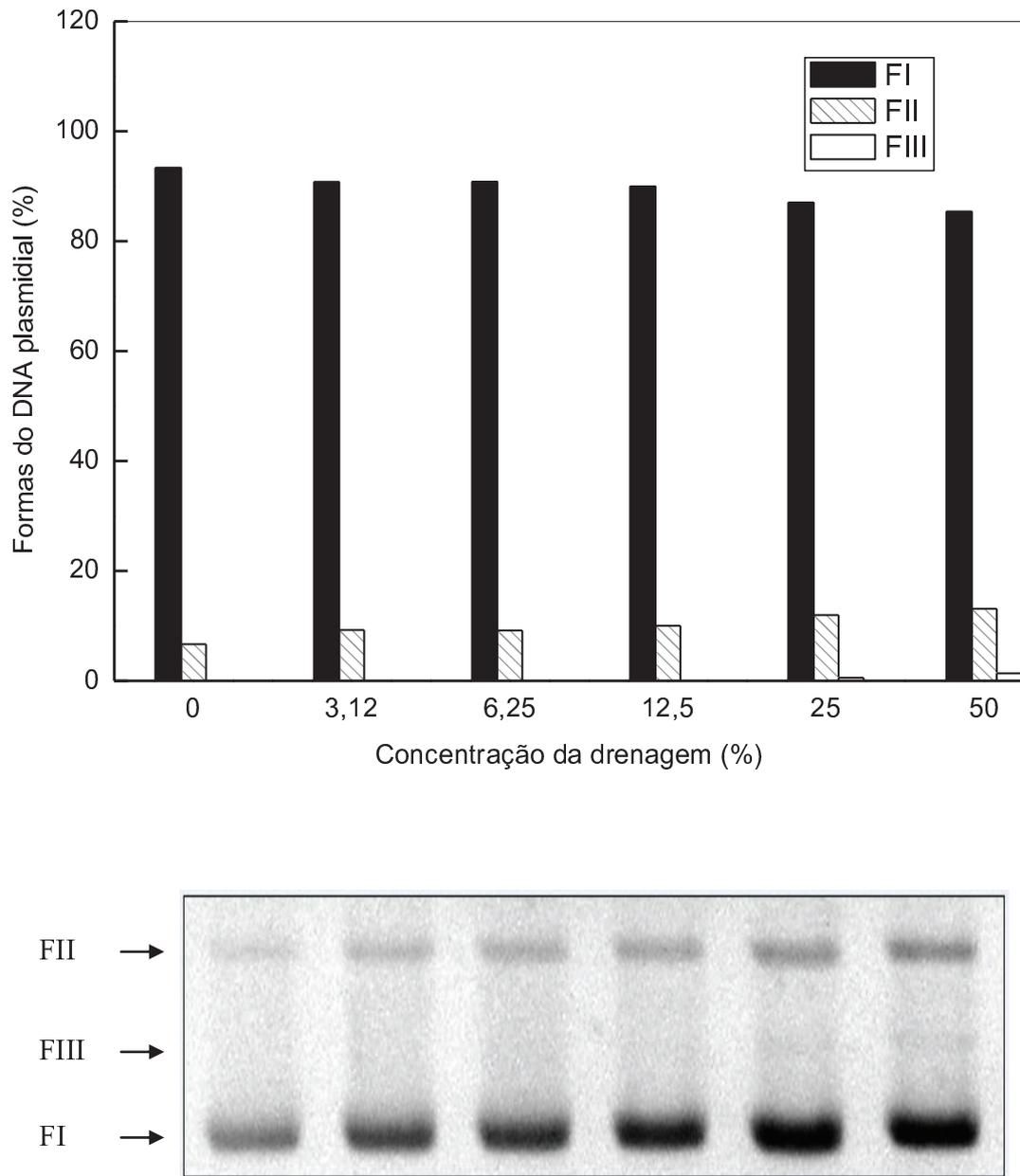


Figura 8. Formas de DNA Plasmidial exposto drenagem ácida de mina tratada com o sedimento calcinado.

A literatura tem descrito o uso do teste de clivagem de DNA plasmidial para avaliação do potencial tóxico de contaminantes ambientais.

Madeira (2009), avaliando a atividade nucleásica do efluente líquido filtrado e não filtrado (amostra 1 e amostra 2) dos lavadores de gases de olarias utilizando o plasmídeo PBSKII, verificou atividade nucleásica para ambas as amostras. Na amostra 1, obteve

resultados semelhantes para o efluente não filtrado e filtrado, percebendo-se a forma linear (FIII) em todas as concentrações dos efluentes, sendo visível o dano pela diminuição da forma superenovelada (FI) e diminuição da forma circular aberta (FII), chegando-se a quase 100% de clivagem linear na última concentração (25%). Na amostra 2, o efluente apresentou maior atividade que o efluente da amostra 1 e o efluente não filtrado demonstrou mais ativo do que o filtrado, sendo que no primeiro o DNA plasmidial foi degradado na primeira concentração (3,12%), enquanto que no segundo a degradação ocorreu na última concentração (12,5%).

Cardoso e colaboradores (2008), avaliando a clivagem de DNA plasmidial pela ação do complexo contendo metal  $[Cu(Tc)(Phen)(H_2O)_2](ClO_4)_2$  em diferentes condições de pH e concentrações, verificaram que o complexo mostrou-se capaz de clivar em todos os pH's testados (6,5 a 9,0), em baixas concentrações (12,5 $\mu$ m), à temperatura constante durante 2 horas de incubação.

Lingard e colaboradores (2005) observaram clivagem de DNA plasmidial promovidos por material particulado contendo metais-traço Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn, sendo sugerido que o efeito genotóxico estaria associado à presença de metais, os quais poderiam promover a geração de espécies reativas de oxigênio que tem a capacidade catalisar transferências eletrônicas e, por consequência, de reagir com ácidos nucleicos "in vitro"

Portanto, os resultados obtidos neste trabalho permitem sugerir que as drenagens não tratadas foram capazes de provocar o efeito genotóxico possivelmente em decorrência da presença de metais em solução, os quais foram capazes de serem removidos após o tratamento com sedimento calcinado e consequente diminuição do dano ao DNA.

## 6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, pode-se chegar às seguintes conclusões:

. A drenagem ácida de mina não tratada apresentou elevada acidez e expressiva concentração de metais, sendo que após o tratamento com o sedimento calcinado observou-se a elevação do pH para valores próximos da neutralidade e relevante redução da concentração de metais, principalmente alumínio, ferro, e manganês;

. A drenagem não tratada apresentou alta toxicidade aguda em *Artemia* sp., sendo que após o tratamento com o sedimento calcinado, foi constatado que não houve mortalidade dos indivíduos expostos em todas as concentrações da drenagem;

. Nos ensaios de fitotoxicidade, observou-se que a drenagem não tratada provocou expressiva inibição do seu crescimento de raízes e número de raízes de *Allium cepa* L. quando comparado com o grupo tratado com sedimento calcinado, sugerindo que o tratamento foi eficiente na remoção dos efeitos sobre a planta. O ganho de peso não mostrou ser significativamente diferente nos grupos avaliados;

. A drenagem não tratada mostrou alta atividade de clivagem de DNA plasmidial, sendo que o tratamento com o sedimento calcinado promoveu uma redução do efeito genotóxico sobre material genético;

. Os feitos tóxicos da drenagem não tratada observados nos bioensaios poderiam estar associados à acidez e presença de metais no meio, sendo que o tratamento com o sedimento calcinado removeu estes contaminantes com conseqüente diminuição da toxicidade;

. O sedimento calcinado poderia ser utilizado como uma alternativa para o tratamento de drenagem ácida de mina de carvão, conferindo uma utilidade econômica ao mesmo e minimizando seus impactos sobre o meio ambiente.

## REFERÊNCIAS

BENASSI, et al. Evaluation of remediation of coal mining wastewater by chitosan microspheres using biomarkers. **Environmental Contamination and Toxicology**, 51, p. 633-640, 2006.

BORGES, Alexandre Blos. **Estudos de toxicidade das águas da bacia Hidrográfica do rio urussanga, utilizando-se organismos bioindicadores *Artemia sp.* e *Daphnia magna*, antes e após a remediação com rejeito de mineração de carvão.** 2009. 35 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade do Extremo sul Catarinense, Criciúma.

BORTOLOTTO, T. et al.. **Evaluation of Acid Mine Drainage Treatment Using *Artemia sp.* and *Allium cepa L.* as Bioindicator of Toxicity and Genotoxicity.** In: NATIONAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF MINING AND RECLAMATION, 26, 2009, Local. Anais do 26<sup>th</sup> National Meeting of the American Society of Mining and Reclamation Local: American Society of Mining and Reclamation, 2009. p. 283-301.

CAMPANER, Veridiana; LUIZ-SILVA, Wanilson. Processos físico-químicos em drenagem ácida de mina em mineração de carvão no sul do Brasil. **Quím. Nova.** Londres, v. 32, nº 1, p. 146-152.

CAMPOS, M. L.; ALMEIDA, J. A. SOUZA, L. S. **Avaliação de três áreas de solo construído após mineração de carvão a céu aberto em Lauro Müller, Santa Catarina.** *Rev. Bras. Ciênc. Solo* [online]. 2003, vol.27, n.6, pp. 1123-1137. ISSN 0100-0683. doi: 10.1590/S0100-06832003000600017.

CARDOSO, Cláudio; FISHER, Franciele Luane; TERENCEZI, Hérrnan. Clivagem de DNA Plasmidial pela Ação do Complexo [Cu(Tc)(Phen)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. XVI ENCONTRO DE QUÍMICA DA REGIÃO SUL (16-SBQSUL), 16., Blumenau. **Anais do XVI Encontro de Química da Região Sul.** Blumenau: Sociedade Brasileira de Química, 2008. p. 1-3.

DEFAVERI, T. M. **Biomonitoramento da Atividade Tóxica e Genotóxica de Drenagem Ácida de Mina Tratada por Processos Químicos, Físicos e Biológicos**. 2009. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências biológicas). Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, Criciúma.

DE LUCA, F. J.; GASTALDON, M. C. Desenvolvimento sustentável e a recuperação das áreas degradadas abandonadas pela mineração do carvão na região sul do estado de Santa Catarina. **Revista de Tecnologia e Ambiente**, Criciúma, v. 5, n. 2, p. 19-33, 1999.

GEREMIAS, R. et al. Use of coal mining waste for the removal of acidity and metal ions al (III), fe (III) and mn (II) in acid mine drainage, **Environmental Technology**. Londres. v. 29, p 863 - 869, 2008.

GEREMIAS, Reginaldo. **Utilização do rejeito de mineração como adsorvente para redução da acidez e remoção de íons de metais em drenagem ácida de mina de carvão**. 2008. 121 f. Tese (Doutorado em Química). Área de concentração: Química analítica. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

GERHARDT, A; JANSSENS de BISTHOVEN, L; SOARES, AMVM. Macroinvertebrate response to acid mine drainage: community metrics and on-line behavioural toxicity bioassay. **Environ Pollution**, 2004. p. 263-274

JOHNSON, B. D.; HALLBERG, K. B. Acid mine drainage remediation options: a review. **Science of the Total Environment** (2005), p. 3-14.

LINGARD, J. J. N. et al. A study of trace metal concentration of urban airborne particulate matter and its role free radical activity as measured by plasmid strand break assay **Atmospheric Environment**, 2005, p. 2377–2384

MADEIRA, Rosana Antônio. **Avaliação da Atividade Tóxica, Genotóxica e Nucleásica de Efluentes dos Lavadores de Gases de Olarias Utilizando *Artemia* sp., *Allium cepa* L. e Plasmídeo PBSKII**. 2009. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma.

NASCIMENTO, F. M. F.; MENDONÇA, R. M. G.; MACEDO, M. I. F.; SOARES, P. S. M. Impactos Ambientais nos Recursos Hídricos da Exploração de Carvão em Santa Catarina. In: **II Congresso Brasileiro de Mina a Céu Aberto e II Congresso Brasileiro de Mina Subterrânea**, 2002, Belo Horizonte. II Congresso Brasileiro de Mina a Céu Aberto e II Congresso Brasileiro de Mina Subterrânea, 2002.

NETTO, Eduardo et al. Cleavage of Plasmid DNA Exposed To Acid Mine Drainage. In: XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2010, Foz do Iguaçu. **Anais da XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2010.

PENNSYLVANIA. Bureau of mining and reclamation. **Coal mine drainage prediction and pollution prevention in pennsylvania**. [Harrisburg. Pa]: Pennsylvania departament of environmental protection, 1998. 1v ( várias paginações)

PICH, Claus Tröger. **Nucleases Sintéticas: Análise da Atividade de Clivagem de DNA, de Clivagem de proteína e Genotóxica de Compostos Metálicos**. 2009. 142 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

QUEIROZ, M. T. A. **Bioacumulação de Metais Pesados no rio Piracicaba, Minas Gerais, Aplicando a Análise por Ativação Neutrônica Instrumental**. 2006. 92 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Industrial). Centro universitário do leste de minas gerais, Coronel Fabriciano.

SCHINEIDER, Carlos H. **Controle da Drenagem ácida de minas na mineração de carvão de Santa Catarina: Caso da mina II – Verdinho**. 2006. 118 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia). Área de Concentração: Tecnologia Mineral e Metalurgia Extrativa – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

SILVEIRA, F.Z. **Avaliação do Potencial de Atividade Tóxica e Genotóxica da Drenagem Ácida de Mina Através de Ensaio Ecotoxicológicos**. 2009. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências biológicas). Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, Criciúma.

SREEDHARA, A.; COWAN, J. A. Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. *J. Biol. Inorg. Chem.* v. 6, p. 337 – 347, 2001.